

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biologická aktivita makromycet - B

Biological activity of macromycetes - B



Vedoucí diplomové práce: Ing. Kateřina Macáková

Hradec Králové 2010

Jana Dočkalová

Poděkování

Především děkuji Ing. Kateřině Macákové za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady a připomínky k teoretické i experimentální části práce a za pomoc při měření antioxidační aktivity. Rovněž děkuji všem pracovníkům Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření dobrých pracovních podmínek a za umožnění využití laboratorních pomůcek a přístrojů, bez kterých bych experimentální část diplomové práce nemohla uskutečnit.

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu SVV-2010-261-002.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Seznam použitých zkratk:

AMK - aminokyseliny

CAT - katalasa

DNA - deoxyribonukleová kyselina

DPPH - 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl

GPx - glutathionperoxidasa

GSH - glutathion

SIA - sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis)

SOD - superoxiddismutasa

VR - volný radikál

OBSAH

I.	ÚVOD	7
II.	CÍL PRÁCE	13
III.	TEORETICKÁ ČÁST	14
1.	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH TAXONŮ	14
1.1	Úvod.....	14
1.2	Systematické zařazení jednotlivých taxonů a jejich morfologická charakteristika.....	14
1.2.1	<i>Agaricaceae</i> - pečárkovité.....	15
	Rod: <i>Cystoderma</i> (zrnivka)	15
1.2.2	<i>Amanitaceae</i> – muchomůrkovité.....	15
	Rod: <i>Amanita</i> (pošvatka).....	16
1.2.3	<i>Bolbitiaceae</i> – slzečníkovité	16
	Rod: <i>Bolbitius</i> (slzečník).....	17
	Rod: <i>Hebeloma</i> (slzivka).....	17
1.2.4	<i>Coprinaceae</i> – hnojníkovité	18
	Rod: <i>Psathyrella</i> (křehutka).....	18
1.2.5	<i>Cortinariaceae</i> – pavučincovité	19
	Rod: <i>Cortinarius</i> (pavučinec)	19
1.2.6	<i>Entolomataceae</i> – závojenkovité	20
	Rod: <i>Rhodocybe</i> (rudoušek)	20
1.2.7	<i>Hygrophoraceae</i> – šťavnatkovité.....	21
	Rod: <i>Hygrophorus</i> (šťavnatka)	21
1.2.8	<i>Lycoperdaceae</i> – pýchavkovité.....	22
	Rod: <i>Lycoperdon</i> (pýchavka).....	22
1.2.9	<i>Tricholomataceae</i> – čirůvkovité	23
	Rod: <i>Oudemansiella</i> (slizečka)	23
	Rod: <i>Tricholoma</i> (čirůvka).....	24
	Rod: <i>Tricholomopsis</i> (šafránka).....	25
2.	CHEMICKÁ SKLADBA HUB	26
2.1	Úvod.....	26
2.2	Primární metabolity.....	27
2.2.1	Bílkoviny.....	27
2.2.2	Lipidy	27
2.2.3	Sacharidy.....	28
2.2.4	Enzymy	29
2.3	Sekundární metabolity	29
2.3.1	Úvod.....	29
2.3.2	Vitaminy.....	30
2.3.3	Pigmenty	30
2.3.4	Vůně a pachy hub.....	31
2.3.5	Chuťové látky hub.....	32
2.4	Minerální látky a voda	32
2.5	Látky izolované z testovaných rodů hub.....	33
3.	ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA	36
3.1	Volné radikály a antioxidanty	36
3.1.1	Volné radikály.....	36
3.1.2	Reaktivní radikálové molekuly v organismu a typy radikálových forem	37

3.1.3	Mechanismus poškození tkáně.....	37
3.1.4	Antioxidační ochranný systém	38
3.1.5	Negativní vliv volných radikálů	38
3.1.6	Antioxidanty	39
3.1.7	Terapeutické možnosti	40
3.1.8	Látky přírodního původu působící antioxidačně.....	40
3.2	Stanovení antioxidační aktivity.....	41
3.2.1	Stanovení antioxidační aktivity.....	41
3.2.2	Sekvenční injekční analýza	41
3.2.3	Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu	42
IV.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	44
1.	POTŘEBY	44
1.1.	Rozpouštědla	44
1.2.	Chemikálie	44
1.3.	Standardy	45
1.4.	Přístrojové vybavení.....	46
1.5.	Detekční činidla	46
1.6.	Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii.....	49
1.7.	Chromatografický adsorbent.....	49
2.	PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ	50
2.1.	Materiál	50
2.2.	Extrakce drogy a příprava lyofilizátu z drog.....	51
3.	HODNOCENÍ EXTRAKTŮ BAREVNÝMI REAKCEMI NA TLC.....	52
3.1.	Vyhodnocení reakcí na detekce D 1 – D 16.....	69
4.	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY DPPH TESTEM S VYUŽITÍM SIA	75
4.1.	Postup práce	75
V.	DISKUZE.....	92
VI.	LITERATURA.....	97
VII.	ABSTRAKT.....	106
VIII.	ABSTRACT	107

I. ÚVOD

Houby byly během staletí přiřazovány buďto k živočichům nebo k rostlinám, po dlouhou dobu byly pokládány dokonce za hermafrodity. Díky moderním molekulárně biologickým výzkumným metodám se dnes ví, že houby, kromě živočichů, rostlin a mikroorganismů, tvoří úplně samostatnou skupinu - říši hub (*Fungi*) (Kohte, 2000).

Houby, rostliny a živočichové jsou tzv. eukaryonta, tj. organismy, jejichž buňky jsou vybaveny pravým buněčným jádrem. Z těchto eukaryont tvoří říše hub velmi početnou skupinu, zahrnující více než čtvrt milionu druhů.

Na rozdíl od rostlin nejsou houby schopny fotosyntézy, nemohou využívat sluneční energii k tvorbě uhlíkatých sloučenin z oxidu uhličitého a vody. Houbám totiž k tomu chybí nezbytná sloučenina – chlorofyl neboli listová zeleň. Organické látky, potřebné pro svoji existenci a růst, musí získávat z živých či mrtvých rostlinných nebo živočišných organismů (Keizer, 1998).

Houby jsou různorodou skupinou organismů, zahrnující pravděpodobně několik samostatných vývojových linií, představovaných odděleními *Myxomycota* (hlenky), *Chytridiomycota* (prvohouby), *Oomycota* (řasohouby) a *Eumycota* (vyšší houby) (Volf, 1988).

Mezi vyššími houbami jsou rozeznávány čtyři různé třídy: zygomycety (*Zygomycetes*) – skupina výhradně mikroskopických hub, vřeckovýtrusné (*Ascomycetes*), stopkovýtrusné houby (*Basidiomycetes*) a houby tzv. nedokonalé (*Deuteromycetes*). Třídy vřeckovýtrusných a stopkovýtrusných hub se odlišují rozdílným způsobem tvorby výtrusů. U vřeckovýtrusných hub se tvoří výtrusy uvnitř zvláštních válcovitých útvarů, tzv. vřecek (*asci*, jedn. č. *ascus*), kdežto výtrusy stopkovýtrusných hub se tvoří zevně na výrůstcích zvláštních buněk - bazidií (Kohte, 2000).

Na rozdíl od většiny rostlin a živočichů se u hub odehrávají četné životní pochody skrytě. A tak útvary, které všeobecně označujeme jako houby, jsou ve skutečnosti jen malými částmi celkového organismu. Houby jsou plodnicemi vyrůstajícími na podhoubí – myceliu. Je to vlastní organismus hub prorůstající různé substráty, např. půdu. Plodnice, jak název napovídá, slouží výlučně k tomu, aby houby rozšiřovaly „plody“ - výtrusy (svou funkcí se dají srovnat se semeny rostlin) a tím se postaraly o další trvání dotyčného druhu. Výtrusy klíčí ve vlákna (hyfy)

členěná přepážkami, která se spojují v podhoubí. Hyfy se těsně proplétají nebo i druhotně srůstají a vytvářejí nepravé pletivo zvané plektenchym. Plodnice houby se může vytvořit jen tehdy, jsou-li zvláště příznivé podmínky k růstu a klíčení výtrusů, tedy většinou za větrného a vlhkého počasí (Keizer, 1998; Kohte, 2000; Kubát, 1998).

Velké houby, makromycety, tvořící plodnice větší než 1 mm, jsou viditelné pouhým okem. Většina velkých hub se rozmnožuje výtrusy vzniklými na základě sexuálních pochodů.

Převážná část mikromycet má plodnice menší než 1 mm. Rozmnožuje se obvykle v asexuální fázi svého životního cyklu, v takzvané imperfektní formě. Na podhoubí se vytváří specializované nosiče spor (konidiofory), kde vznikají konidie, nepohlavní spory, a to uvnitř nebo na povrchu konidiofor (Keizer, 1998).

Výtrusy obsahují mj. hodně zásobních látek (např. polysacharid glykogen). Mohou se šířit na velké vzdálenosti ve vyšších vrstvách atmosféry. Dá se říci, že jsou všudypřítomné a záleží jen na tom, zda dopadnou na vhodný substrát a zda nastanou příhodné klimatické podmínky, aby mohly vyklíčit (Keizer, 1998; Kubát, 1998).

Spory jsou velice odolné, mohou přežívat za nepříznivých podmínek i dvacet roků bez náznaku života. Snesou teplotu až +150 °C, případně suché a chladné podmínky.

Přes svoji velkou životaschopnost potřebuje každá houba ke svému životu zcela specifické podmínky. Jsou velice citlivé na charakter půdy, pH půdy, její chemické a minerální složení, na vlhkost a teplotu ovzduší (Kovář, 1999).

Způsob života hub

Jelikož houby nemají chlorofyl ani jiné fotosyntetické pigmenty, musí získávat pro svůj život důležité látky z jiných organismů. Proto jsou vázány na zelené rostliny nebo na zbytky živočichů, z nichž získávají nutné živiny. Podle způsobu života hub rozlišujeme houby saprofytické, parazitické a symbiotické (Bielli, 2001).

Saprofytické houby

Většina hub žije saprofyticky. To znamená, že rostou na mrtvých nebo zetlelých rostlinných organismech, na spadaném listí, jehličí, odpadlé kůře, tlejícím dřevě nebo na hnoji. Ve vzácných případech osídlují i mrtvý hmyz.

Jako rozkladači organických látek hrají houby velmi významnou roli v ekologii lesa, starají se o rychlý rozklad spadaného listí, větví, odumřelých stromů a přispívají k tomu, že se les přirozeně čistí (Bielli, 2001).

Parazitické houby

Tyto houby žijí na úkor jiných žijících, převážně rostlinných, organismů. Osídlují s oblibou mohutné stromy, přičemž stačí drobné poranění v kůře, aby umožnilo vniknutí výtrusů houby. Mnohdy se podaří výtrusům hub najít příhodnou hostitelskou rostlinu s pomocí hmyzu živícího se dřevem nebo žijícího ve dřevě či pod kůrou stromů. Důležitou roli zde hraje lýkožrout. Vlákná parazitických hub vnikají do tkáně rostliny a postupně vytvářejí hustě spletenou síť z plstnatých bílých svazečků, které svému hostiteli neustále odnímají živiny a tím jej postupně usmrcují. Existují také parazitické houby, které rostou na jiných houbách a jsou přitom vázány na jeden zcela určitý druh. Mezi saprofytickým a parazitickým způsobem života hub však není ostrá hranice. Pokud to dovolí vnější podmínky, mnohé parazitické houby přecházejí k saprofytickému způsobu života. Četnými příklady jsou choroše, hlívy a známé václavky, které svou hostitelskou rostlinu vzhledem k odnímání živin nejprve nechají zahynout a potom se vyživují z odumřelých částí (Bielli, 2001).

Symbiotické houby

Pro některé houby je charakteristická symbióza. Projevuje se jednak jako mykorrhiza, při níž dochází k soužití mycelia s kořeny cévnatých rostlin, jednak jako lichenismus, což je těsné soužití houby se sinicí nebo řasou takového stupně, že vzniká morfologicky i ekologicky odlišný organismus – lišejník (Kubát, 1998).

Když se mycelium, rozrůstající se v půdě, setká s kořenem, obklopí jeho vnější povrch bílým vatovým vlášením. Někdy je vidět i pouhým okem (ektotrofní mykorrhiza), v jiných případech vnikají houbová vlákna (hyfy) hluboko do kořenových buněk (endotrofní mykorrhiza). V obou případech odnímá houba rostlině cukry a další důležité živiny, které potřebuje pro svůj růst. Navenek se nijak neprojevuje, že by strom tímto vztahem mohl trpět. Spíše naopak, symbióza s houbou mu umožňuje snáze získávat určité, pro jeho život velmi důležité, látky jako jsou sodík, draslík nebo fosfor. Bylo například zjištěno, že stromy, které rostou na půdě s nízkým obsahem minerálů a mají vytvořenou mykorrhizu s houbou, se vyvíjejí podstatně lépe než stromy bez spojení s houbou (Bielli, 2001).

Malá část makromycetů je specializována na symbiózu s jediným druhem stromu, kdežto většina může vytvářet mykorrhizu s více druhy stromů (Keizer, 1998).

V mnoha případech je mykorrhiza pro přežití obou partnerů nepostradatelná (Bielli, 2001).

Význam hub v přírodě a pro člověka

Růstem rostlin je ročně vytvořeno asi 100 miliard tun biomasy. Ta musí být znovu odbourána a navrácena v přírodě do koloběhu látek, aby nedošlo k jeho zastavení. Houby společně s bakteriemi mají v koloběhu životních procesů úlohu destruentů, tj. organismů, které převádějí nahromaděné organické sloučeniny do formy sloučenin anorganických, jejichž část je opět využívána producenty (autotrofními rostlinami). Přitom se přesně neví, jak velký je podíl obou skupin organismů na jednotlivých procesech. Je však jisté, že houby hrají rozhodující roli při rozkladu dřeva, čímž se významně podílejí na rozkladu rostlinné biomasy (Kohte, 2000; Kubát, 1998).

Houby ale hrají v celkovém hospodářství přírody důležitou roli i v jiném ohledu, a to tím, že tvoří mykorrhizní symbiózu. Často vstupuje jedna a tatáž houba v rámci této symbiózy do spojení dokonce s více než jedním stromem, takže velké plochy lesních půd jsou propojeny hustou souvislou sítí houbových hyf (Kohte, 2000).

Důležitost hub dosud není plně doceněna v půdoznalectví, jehož součástí je mj. půdní biologie, dále v nauce o chorobách rostlin (fytopatologii), v pěstování plodin a dřevin a ve zdravém vývoji přirozených i umělých ekosystémů (existence a využití endomykorrhizy a ektomykorrhizy). Houby se uplatňují např. při výrobě potravin a píce.

Zdůrazněním významu v ekologii je doceněn již dávno uznávaný význam v průmyslu potravinářském (výroba lihovin, sýrů aj.), kde se houby poprvé uplatnily v biotechnologii. Dnes je do této vědy možno zařadit využití hub jako producentů bílkovin z odpadních a levných surovin. Rozvoj biotechnologických metod pokračuje dále až k požadovaným uzavřeným bezodpadovým cyklům jakým je např. rozklad lignocelulózového odpadu pomocí basidiomycetů i askomycetů. Biotechnologických metod je užíváno též při průmyslovém pěstování konzumních hub (hlívy ústříčné, límcovky obrovské aj.), které již našlo způsob jak dále zužitkovat vyplozený substrát (Kubát, 1998).

Negativní vliv parazitických hub se projevuje poškozováním lesních, zemědělských i zahradních kultur a plodin (Semerdžieva, 1986).

Houby jsou odedávna pochutinou, význam má jejich vůně a chuť. Houbaři propagovaná výživnost a energetická hodnota je ve skutečnosti velmi malá (málo bílkovin, tuků i cukrů). Na druhé straně mají houby vysoký podíl minerálních látek a vitamínů. Názory na výživnou hodnotu hub se blíží nejčastěji dvěma krajním hodnocením: první říká, že houby se vyrovnají masu (tzv. „maso lesa“), podle druhého jsou jen těžko stravitelné a látky, které obsahují, jsou v nestrávené podobě vyloučeny z těla. Pravda je někde uprostřed (Klán, 1999; Kubát, 1998).

Chuťovými vlastnostmi a přítomností aromatických látek mají houby blahodárný vliv na vyměšování trávicích šťáv. Část nestravitelných bílkovin a polysacharidů ovlivňuje trávicí pochody, výsledkem je urychlování vyměšování. Vlákna v houbách byla dříve považována za balastní, tedy nepotřebnou. Dnes už víme, že vlákna je v současné stravě naopak nedostatek, což může spolu s dalšími faktory přispět ke vzniku rakoviny střev a dalších chorob. Houby vyvolávají pocit nasycení, proto jsou vhodnou složkou různých redukčních diet a měly by se spolu se zeleninou objevovat v jídelničkách daleko častěji než dosud (Kovář, 1999).

Někdy se tvrdí, že tepelnou úpravou, která je u nich obvykle nezbytně nutná, přicházejí houby o větší část svých vitamínů. To ale částečně platí např. o vitamínu C, B₁ a B₁₂, zejména pokud se pokrm vaří či smaží delší dobu. Avšak vitaminy B₂ a P-P zahřátí téměř nepoškozuje. Kromě vitamínů jsou houby také zdrojem minerálních látek, flavonoidů a bílkovin (Mikulcová, 2006; Kovář, 1999; Kubát, 1998).

Mnoho druhů hub obsahuje látky, které lidskému organismu škodí. Nejde pouze o bezprostředně působící toxické látky, které vyvolávají akutní otravu, ale také o další, většinou dosud neznámé, toxiny. Ty se mohou v lidském těle opakovaným požíváním některých hub hromadit a nepříznivě narušovat činnost různých orgánů, zejména zažívacích.

Definovat pojem jedlá houba je opravdu obtížné. Až dosud se považují za jedlé ty druhy hub, které po dostatečné tepelné úpravě (uvařené, usmažené, opečené) nevyvolávají žádné zdravotní obtíže (Svrček, 1997).

Jak příznivý (antibakteriální, antimykotický), tak i škodlivý (dermatomykózy, kandidózy, aspergilózy aj.) vliv hub se projevuje v humánní i veterinární medicíně.

Určitou úlohu hrají houby ve farmaceutickém průmyslu jakožto producenti léků ve vnitřním lékařství a v psychiatrii (Kubát, 1998).

II. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je příprava extraktů a lyofilizátů z hub, dále vypracování základního fytochemického screeningu 14 taxonů hub z čeledí *Agaricaceae*, *Amanitaceae*, *Bolbitiaceae*, *Coprinaceae*, *Cortinariaceae*, *Entolomataceae*, *Hygrophoraceae*, *Lycoperdaceae*, *Tricholomataceae*, který spočívá v získání dostupných informací o obsahových látkách hub a v důkazu určitých skupin obsahových látek pomocí TLC a selektivních detekcí. Detekce bude provedena na přítomnost AMK, aminů, cukrů, laktonů, sterolů, steroidů, terpenů, triterpenů, alkaloidů, fenolických sloučenin, karboxylových kyselin a vyšších alkoholů.

Poslední část diplomové práce je zaměřena na kvantifikaci antioxidační aktivity vodně-ethanolických extraktů hub s využitím metody sekvenční injekční analýzy (SIA). Stanovení spočívá v redukci stabilního radikálu 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) antioxidantem. Toto stanovení si klade za cíl odhalit extrakty s obsahem potenciálně účinných antioxidačních látek.

III. TEORETICKÁ ČÁST

1. CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH TAXONŮ

1.1 Úvod

Sledované taxony systematicky zařazujeme do čeledí *Agaricaceae* (pečárkovité), *Amanitaceae* (muchomůrkovité), *Bolbitiaceae* (slzečnickovité), *Coprinaceae* (hnojníkuvité), *Cortinariaceae* (pavučinovité), *Entolomataceae* (závojenkovité), *Hygrophoraceae* (šťavnatkovité), *Lycoperdaceae* (pýchavkovité), *Tricholomataceae* (čirůvkovité), řádu *Agaricales* (lupenaté), které patří do třídy *Basidiomycetes* (stopkovýtrusé), oddělení *Eumycota* (pravé houby), říše *Fungi* (houby) (Bielli, 2001; Volf, 1988).

1.2 Systematické zařazení jednotlivých taxonů a jejich morfologická charakteristika

Agaricales – lupenaté

Většinou jde o saprofytické houby, jejichž mycelium žije často v symbióze s kořeny lesních dřevin (mykorrhiza). Masité plodnice vznikají za určitých povětrnostních podmínek, trvají omezenou, často velmi krátkou, dobu a mají většinou sterilní nohu (třeň, *stipes*) a klobouk (*pileus*) nesoucí naspodu lupenovitý (lamelární) nebo rourkovitý (tubulární) hymenofor. Mladá plodnice bývá někdy zakrytá závojem (*velum partiale*) nebo obalem (*velum universale*). Po rozvinutí klobouku se závoj roztrhne a na třeni zůstane prstenec (*annulus*), z obalu na bázi třeně pochva (*volva*) a na povrchu klobouku útržky (bradavky) obalu (např. u muchomůrky). Řád obsahuje asi 10 000 druhů, z nichž je mnoho jedlých, ale i jedovatých (Volf, 1988).

1.2.1 *Agaricaceae* - pečárkovité

Pečárkovité mají masité plodnice s centrálním třeněm, který se dá od dužniny klobouku lehce oddělit a nese prsten. Lupeny jsou husté, volné, vysoké, tenké. Pokožka klobouku je často šupinatá nebo vločkovitá, trama lupenů pravidelná nebo nepravidelná, výtrusný prach je bílý, nazelenalý, růžový, červenohnědý, rezavě či purpurově hnědý, výtrusy jsou hladké, zřídka bradavčité, často tlustostěnné. Plodnice rostou na zemi, hnoji a humusu. Z hlavních rodů jmenujme pečárku (*Agaricus*), bedlu (*Lepiota*, *Macrolepiota*) a zrnivku (*Cystoderma*) (Svrček, 1997).

Rod: *Cystoderma* (zrnivka)

Druh: *Cystoderma terrei* (Berk. & Broome) Hatmaja (zrnivka rumělková)

Syn: *C. cinnabarinum*



Obrázek 1: *Cystoderma terrei* (Berk. & Broome) Hatmaja (Junek¹, 2005)

Klobouk má 3-8 cm v průměru, v mládí je kuželovitý až zvonovitý, na okraji často hrubě zbrázděný až laločnatý, později skoro ploše rozložený, živě oranžově až rumělkově červený, stářím nebo na slunci často vybledlý až do žluté barvy, na povrchu zrnitý. Lupeny jsou velmi husté a čistě bílé, s četnými kratšími lupínky. Třeň je

4-7 cm vysoký a 0,5-1 cm tlustý, dole kyjovitě rozšířený až do dvojnásobné tloušťky, rovný nebo zahnutý, v horní části nad prstenem bílý, lysý a hladký, pod prstenem rumělkově šupinatý. Prsten je bílý, vločkatý, někdy však nezřetelný nebo úplně mizí. Dužnina je bílá, mírné chuti. Vyskytuje se ve všech typech lesů na humózních, kyselých půdách. Je rozšířena v Evropě, vyskytuje se i v Japonsku. Je jedlá, ale nechutná (Laessøe, 2004; Příhoda, 1988).

1.2.2 *Amanitaceae* – muchomůrkovitě

Tato čeleď zahrnuje podstatnou část mykorrhizních druhů. Zástupci obvykle vytvářejí mohutné klobouky, které jsou často pokryté zbytky plachetky v podobě bělavých škráloupů, papil nebo bradavek. Lupeny jsou u muchomůrkovitých

většinou bílé a volné, nejsou přirostlé k třeni. Třeň je válcovitý, tenký a na bázi většinou hlízovitě ztlustlý. Třeň lze lehce vyломit z dužniny klobouku. Často bývá obklopen více či méně vytvořenou pochvou, která představuje odtrženou spodní část plachetky (*vela*). Pochva je mnohdy pomíjivá, jindy není dobře patrná, protože sedí v zemi. Výtrusy jsou většinou bílé, hladké a oválné. Řadíme sem velice početný rod muchomůrka a pošvatka (*Amanita*) a nevelký rod slizobedla (*Limacella*), dříve počítaný mezi bedly. Některé druhy, např. muchomůrka jízlivá, jsou velmi jedovaté a požití malého množství těchto muchomůrek může končit smrtí (Bielli, 2001; Svrček, 1997).

Rod: *Amanita* (pošvatka)

Druh: *Amanita crocea* (Quél.) Kühner & Romang. (pašvatka šafránová)



Obrázek 2: *Amanita crocea* (Quél.)
Kühner & Romang. (Opletal¹, 2005)

Klobouk má v průměru 3-8 cm, zprvu kuželovitý nebo zvonovitý, pak sklenutý až plochý, oranžový až červenooranžový, většinou holý, bez blanitých útržků plachetky. Lupeny jsou husté, bílé, v dospělosti žlutě krémové. Třeň je zprvu hladký, později žíhaný, bílý, 10-15 cm dlouhý, 1-2 cm tlustý bez prstenu, na spodu obalený vysokou cípatou bílou pochvou. Dužnina je bělavá, vodnatá, velmi křehká, neměnná, chuti nasládlé, vůně nevýrazné. Roste v červenci až říjnu v lesích všech typů, ale i mimo les, v hájích, sadech a zahradách. Je jedlá (Erhartovi, 1995; Svrček, 1997).

1.2.3 *Bolbitiaceae* – slzečnickovité

Zástupci této čeledi jsou středně velké houby řazené do rodů: slzečník (*Bolbitius*), čepičatka (*Conocybe*), slzivka (*Hebeloma*) a polnička (*Agracybe*), které dohromady čítají asi 80 druhů. Jejich klobouk je většinou vyklenutý až zvonovitý a má hladkou, lesklou, případně suchou pokožku, která je většinou rýhovaná a světle zbarvená. Třeň je většinou štíhlý a válcovitý, mnohdy má vytvořený prsten. Lupeny jsou tenké, vysoké, mohou být volné nebo přirostlé a postupně stále tmavnou. Výtrusy mají převážně hnědou barvu a jsou vejčité. Většina těchto hub žije

saprofyticky v podrostu nebo houštinách, zvláště na tlejícím dřevě, často také na trusu hovězího dobytka či koní na polích a pastvinách. Některé druhy jsou jedlé, mnohé velmi chutné, jiné naopak jedovaté a mohou vyvolávat halucinace (Bielli, 2001; Svrček, 1997).

Rod: *Bolbitius* (slzečník)

Druh: *Bolbitius vitellinus* (Pers.) Fr. (slzečník žlutkový)



Obrázek 3: *Bolbitius vitellinus* (Pers.) Fr. (Opletal², 2005)

Klobouk kuželovitý až zvonovitý, pak ploše rozložený, s hluboce rýhovaným okrajem, průměr 1-4 cm, slizký, průsvitný, chromově žlutý nebo žloutkově žlutý, vybledající do šedohnědavé barvy. Lupeny husté, bledě žluté, pak skořicově hnědé. Třeň 3-8 x 0,2-0,4 cm, dutý, křehký, jemně ojíňený, bělavě žlutý, na bázi bíle pýřitý. Dužnina tenká, bledá, bez zvláštního pachu a chuti. Hojný na humózních půdách, na kompostech, na vyhnojených trávnících v sadech, zahradách, parcích, na loukách a při cestách. Vyskytuje se od léta do podzimu. Žije saprofyticky. Je to houba nejedlá (Keizer, 1998; Svrček, 1997).

Rod: *Hebeloma* (slzivka)

Druh: *Hebeloma circinans* (Quél.) Sacc. (slzivka kruhová)



Obrázek 4: *Hebeloma circinans* (Quél.) Sacc. (Gutén, 2009)

Klobouk 10-40 (70) mm, polokulovitý, zvonovitý, pak téměř plochý, na okraji podvinutý, ojíňený a krátce brázditý, masově nahnědlý až masově okrový, na okraji světlejší. Lupeny připojené, okrové až rezavě hnědé, s masovým nádechem, na ostří bělavé, vločkaté, neslízí. Třeň 30-80 x 5-10 mm, válcovitý, na bázi kyjovitý až téměř

vřetenovitý a obvykle zakřivený, na vrcholu vločkatý a bílý, jinde světle okrový, celý s masovým nádechem, bez vela. Roste hojně, obvykle ve skupinách nebo kruzích, na loukách a pastvinách, pod smrky na okraji lesa, vždy v horských a subalpinských polohách, především na vápnatých půdách. Houba je nejedlá (Hagara, 2000; Antonín, 2006).

1.2.4 *Coprinaceae* – hnojníkovité

K této čeledi řadíme drobné až středně velké houby štíhlého vzrůstu. Klobouk může být kuželovitý, zvonovitý, vypouklý, ale i plochý. Povrch klobouku je buď hladký, pokrytý šupinami nebo bradavičnatý. Třeň je hladký, jemně vláseňovitý, vzácněji rýhovaný a poněkud hlízovitý. Hustě uspořádané lupeny jsou buď hladké nebo přirostlé ke třeni, v době zralosti se roztékají (zvláště u rodu *Coprinus*), tj. změní se na vazkou černou tekutinu. Výtrusy mají tmavohnědou až černou barvu a různý tvar. Do čeledi hnojníkovitých patří hojníky (*Coprinus*), křehutky (*Psathyrella*, *Lacrymaria*) a kropenatce (*Paneolus*). Všechny žijí saprofytičky, mnohdy koprofilně (rostou na trusu a na hnoji). Pouze malé množství druhů je jedlých, mnohé jsou naopak jedovaté. Většina je nezajímavá především proto, že plodnice jsou drobné a málo masité (Bielli, 2001).

Rod: *Psathyrella* (křehutka)

Druh: *Psathyrella multipedata* (Peck) A. H. Sm. (křehutka rozvětvená)



Obrázek 5: *Psathyrella multipedata* (Peck) A. H. Sm. (Nejeschleba, 2009)

Klobouk polokulovitý až kuželovitý nebo zvonovitý, průměr 10-25 mm, hladký, matný, rýhovaný, za vlhka okrově hnědý až šedohnědý, za sucha bělavě šedý až světle okrově hnědavý nebo kožově hnědý. Lupeny světle šedohnědé, pak tmavě fialovohnědé. Třeň 3-10 x 0,2-0-4 cm, dutý, křehký, bělavý, bíle plstnatý na bázi, kde jsou třeně

trsovité spojené. Dužnina oranžově hnědavá až kožovitě hnědá. Chut' mírná, vůně nenápadná. Vyskytuje se roztroušeně na zemi v listnatých lesích, parcích, alejích,

často na zatravněných parcelách, na bohatých jílovitých či hlinitých půdách. Žije saprofytický, je nejedlá (Keizer, 1998).

1.2.5 *Cortinariaceae* – pavučincovité

Pavučincovité představují velmi nejednotnou čeleď, k níž řadíme houby rozličných tvarů a velikostí. Téměř všechny druhy však mají tenký, válcovitý třen, s výjimkou zástupců rodu trepkovitka (*Crepidotus*), jejichž lopatkovitý klobouk bez třeně přisedá na substrát. Více méně husté lupeny mohou být sbíhavé nebo volné, tj. nepřirostlé k třeni. Rod pavučinec (*Cortinarius*) je jen obtížně zaměnitelný, a to zvláště mladé exempláře, neboť má mezi kloboukem a třeněm silně vyvinutý pavučincovitý závoj (*velum parziale*). S pokračujícím dozráváním plodnic se tento závoj pozvolna rozpouští a zanechává mnohdy na třeni pouze slabě lepkavý prstenovitý proužek. Výtrusy u této čeledi hub jsou velmi rozličného tvaru (kuželovité, oválné, mandlovité, ale i fazolovité) a jsou většinou žlutohnědé nebo červeně až rezavě zbarvené, jen výjimečně bílé. Pavučincovité jsou většinou mykorrhizní houby, ale nalezneme mezi nimi i některé paraziticky nebo saprofytický žijící druhy. Čeleď zahrnuje 16 rodů, z nichž nejdůležitější jsou pavučinec (*Cortinarius*) s více než 250 druhy, vláknice (*Inocybe*), kržatka (*Naucoria*) a šupinovka (*Pholiota*). Houby z čeledi pavučincovitých jsou většinou nejedlé nebo jedovaté. Pouze malé množství druhů je vhodné pro kuchyni (Bielli, 2001; Svrček, 1997).

Rod: *Cortinarius* (pavučinec)

Druh: *Cortinarius traganus* (Fr. ex Fr.) Fr. (pavučinec kozlí)



Obrázek 6: *Cortinarius traganus* (Fr. ex Fr.) Fr. (Opletal³, 2005)

Klobouk v mládí kulovitý a na tlustém třeni knoflíčkovitě nasazený, později sklenutý, na kraji třásnitě plstnatý, ve stáří plochý. Zprvu bledě ametystově fialový a hedvábitě šupinatý, později vybledající a okrově zbarvený, až 12 cm v průměru. Lupeny v mládí šafránově až okrově hnědé, později

tmavě rezavě hnědé, řidší. Třeň bledě fialový, na bázi hnědavý, pod vláknitým proužkem v místě prstenu poprášený rezavě hnědými výtrusy. Je povlečen modravou třpytivou blanou a na bázi je kyjovitě hlíznatý. Dužnina je bledě okrově žlutá se silně pronikavým pachem. Od léta do pozdního podzimu nacházíme tuto houbu jednotlivě nebo ve skupinách na kyselých půdách v lesích jehličnatých i listnatých. Nejedlý. Plodnice mohou po požití vyvolat zažívací potíže, ale již pro nepříjemný zápach dužniny nejsou požitelné (Grünertovi, 1995; Příhoda, 1988).

1.2.6 *Entolomataceae* – závojenkovité

Houby této čeledi jsou většinou drobnější velikosti, pouze vzácně mezi nimi nalezneme větší. Klobouk má většinou vyklenutý nebo zvonovitý tvar, jeho povrch je hladký nebo rýhovaný. Lupeny těchto hub jsou více či méně husté a jsou buď přirostlé k třeni nebo sbíhavé. Třeň je válcovitý, někdy má i slabě hlízovitý tvar, středový až postranní nebo se vůbec nevyskytuje. Výtrusy jsou většinou hranaté, protáhlé, neamyloidní. Základním rodem je závojenka (*Entoloma*), rod s klamným českým názvem, neboť nikdy nemá závoj. Toto jméno dnes někteří mykologové používají jako jediný rodový název pro všechny druhy, které v původním pojetí představovaly celkem šest samostatných rodů: závojenka (*Entoloma*), zvonovka (*Nolanea*), trávnička (*Leptonia*), hloubenka (*Eccilia*) rudoušek (*Rhodocybe*) a kulháček (*Claudopus*). Dohromady čítají více než sto druhů a s výjimkou rudouška uťatého (*Rhodocybe gemina*) jsou nejedlé až jedovaté (Bielli, 2001; Svrček, 1997).

Rod: *Rhodocybe* (rudoušek)

Druh: *Rhodocybe gemina* (Fr.) Kuyper & Noordel. (rudoušek uťatý)

Syn: *R. truncata*



Obrázek 7: *Rhodocybe gemina* (Fr.) Kuyper & Noordel. (Malý, 2007)

Klobouk zprvu vyklenutý pak plochý, průměr 8-12 cm, ojnělý až hladký, světle načervenalé okrový až žlutohnědě mramorovaný nebo kaštanový. Lupeny sbíhavé, světle načervenalé okrové. Třeň 3-8 cm x 1-2 cm, bělavý až světle načervenalé okrový. Dužnina bledá.

Vyskytuje se na humusu v listnatých a jehličnatých lesích a parcích na humózních, také i vápenitých půdách. Často ve skupinách či „čarodějných“ kruzích, roztroušeně. Saprophytický, jedlý (Keizer, 1998).

1.2.7 *Hygrophoraceae* – šťavnatkovité

Jedná se převážně o středně velké houby. Třeň je většinou válcovitý a nemá ani prsten ani pochvu. Povrch klobouku je hladký, často lepkavý nebo slizký a většinou lysý. Lupeny jsou nepřilíživé a mají voskovité vzezření. Jsou volné nebo po tření sbíhavé. Výtrusy jsou bílé, oválného tvaru. Zástupci této čeledi rostou téměř výlučně na zelených plochách, obvykle na vápenitých půdách. Všechny druhy jsou jedlé, mnohé z nich jsou velmi chutné. K šťavnatkovitým patří rody šťavnatka (*Hygrophorus* a *Camarophyllus*) a voskovka (*Hygrocybe*) (Bielli, 2001).

Rod: *Hygrophorus* (šťavnatka)

Druh: *Hygrophorus pratensis* (Pers.) Fr. (šťavnatka luční)

Syn: *Camarophyllus pratensis*



Obrázek 8: *Hygrophorus pratensis* (Pers.) Fr. (Boom, 2008)

Jen v mládí zvonovitý klobouk je ve zralosti vmáčkklý s hrbolem uprostřed. Dužnina je tlustá, na okrajích tenká. Pokožka klobouku je oranžově rezavá, meruňkově béžová, lysá a hladká. Tlusté a voskovité lupeny sbíhají daleko po tření a mají v podstatě stejnou barvu jako klobouk. Ostří je světlejší. Lysý, hladký třeň dorůstá

výšky až 7 cm, směrem dolů se zužuje, je 1,5 cm tlustý a směrem ke klobouku je stále tlustší. Jeho hedvábně lesklá barva je znatelně světlejší než barva klobouku. Dužnina se barvou podobá třeni, uvnitř je světlejší, nemá vůni. Objevuje se nejdříve v září a roste téměř do konce listopadu převážně na loukách a pastvinách. V lese ji najdeme jen stěží. Tato šťavnatka patří k houbám rozšířeným po celé Evropě, není však příliš hojná. Je jedlá (Grünertovi, 1995; Keizer, 1998).

1.2.8 *Lycoperdaceae* – pýchavkovité

Pýchavkovité rostou většinou na povrchu půdy (alespoň v době zralosti) a mají kulovitý, hruškovitý nebo kyjovitý tvar. Mohou být stopkaté a mají silnou vnější okrovku s ostny, které snadno odpadávají a zanechávají síťovitou strukturu. Okrovka je složena z vnější tenké a rozpadavé vrstvy (exoperidie) a z vnitřní, většinou tenké papírovité vrstvy (endoperidie), která se otevírá drobným ústím nebo se nepravidelně rozpadává. Často se na bázi objevují vlákna mycelia, která jsou zakotvena v půdě jako kořeny. Teřich vyplňuje celý vnitřek plodnice nebo na její spodní části přechází ve sterilní pletivo. Výtrusy jsou kulovité, malé, barevné. K hlavním rodům patří pýchavky (*Lycoperdon*), prášivky (*Bovista*, *Calvatia*) a vatovec (*Langemannia gigantea*) s plodnicemi měřícími až 50 cm v průměru, čímž se řadí mezi největší houby vůbec. Většina pýchavkovitých jsou jedlé houby, mnohé dokonce vynikající kvality, avšak pouze pokud je teřich bílý. Některé mají nepříjemný zápach, malé množství druhů je jedovatých (Bielli, 2001; Svrček, 1997).

Rod: *Lycoperdon* (pýchavka)

Druh: *Lycoperdon pyriforme* Schaeff. (pýchavka hruškovitá)



Obrázek 9: *Lycoperdon pyriforme* Schaeff. (Opletal⁴, 2005)

Plodnice je 2-5 cm vysoká a 2-5 cm široká, vejčitá nebo obráceně hruškovitá a tak zdánlivě se třením, nahoře někdy s malým hrbolem, na spodu se silnými bílými provázky mycelia. V mládí je bílá, později žlutohnědá až tmavě hnědá, s povrchem jemně bradavčitém. V době zralosti vzniká nahoře malý okrouhlý otvor, z něhož se uvolňují

výtrusy. Vnitřek tvoří nahoře plodonosný teřich (gleba) a dole sterilní třeň. Gleba je v mládí bílá a pevná, později žlutozelená, kašovitější, v době zralosti hnědavá a prášící, zatímco sterilní třeň zůstává většinou bělavý. Vůně ostře nepříjemná. Je běžná na tlejících pařezech a dřevě listnatých stromů nebo na humózní půdě, v nahlučených skupinách v křovinách, parcích, na loukách a na písčinách. Někdy se plodnice objeví i na zemi, jsou však podhoubím spojeny s kořeny pařezů. Jinak je

obecně rozšířená a hojná. Plodnice tvoří od srpna do listopadu. V mládí je jedlá, pokud je vnitřek plodnice ještě bílý (Grünertovi, 1995; Keizer, 1998; Kohte, 2000).

1.2.9 *Tricholomataceae* – čirůvkovité

V této čeledi nacházíme druhy rozličných velikostí i tvarů, jako např. čirůvky (*Tricholoma*), které jsou téměř všechny jedovaté, strmělky (*Clitocybe*), jejichž klobouk je často vmáčklý až nálevkovitý, václavku obecnou (*Armillariella mellea*), rostoucí obvykle v trsech, dále špičky rodů *Marasmius* s často velmi tenkými, tuhými masitými třeni a *Marasmiellus*, osídlující odumřelé větve. Dále také slizečky (*Oudemansiella*). Lupeny bývají k třeni přirostlé až dlouze sbíhavé a u třeně typicky vykrojené. Kuželovité nebo oválné výtrusy mají bělavé až růžové či fialové zbarvení, jsou hladké nebo ornamentované. Mnohé houby této čeledi žijí saprofytický nebo parazitický, ostatní jsou většinou mykorrhizní (Bielli, 2001; Svrček, 1997).

Rod: *Oudemansiella* (slizečka)

Druh: *Oudemansiella mucida* (Schrad. ex Fr.) Hohn. (slizečka slizká)



Obrázek 10: *Oudemansiella mucida* (Schrad. ex Fr.) Hohn. (Walterová, 2006)

Klobouk je v mládí kulovitý, později rovnoměrně sklenutý, bílý až světle šedý, poněkud vrásčitý, tlustý, potažený průsvitným hlenem, tenký, ve stáří na okraji rýhovaný, až 6 cm v průměru. Barva klobouku bývá od bílé, bleděžluté přes lehce našedlou až občas do hnědošedé.

Pokožka je lehce průsvitná. Lupeny bílé, tlusté a řídké, voskovitého

vzhledu. Výtrusy bílé. Třeň 5-14 x 0,4-1,2 cm, rýhovaný nebo šupinkatý, bílý s blanitým, bílým límečkem. Na povrchu jsou jemné vločky a na špičce třeně jemné rýhování. V horní části třeně visí pomíjivý prsten, který je široký, bílý a rýhovaný. Báze je často cibulovitě ztlustěná. Při naříznutí se objeví bílá dužnina. Vůně slabá, nakyslá. Běžná na kmenech a větvích starých buků, vzácněji i dubů. Roste v trsech, někdy i jednotlivě. Je rozšířena po celém světě, v Evropě roste v bučinách. Je to podzimní houba, saprofytická (parazitická), jedlá. Mycelium produkuje antibiotikum

mucidin používané při léčbě některých kožních onemocnění (Grünertovi, 1995; Keizer, 1998; Příhoda, 1988; Svrček, 1997).

Rod: *Tricholoma* (čirůvka)

Druh: *Tricholoma album* (Schaeff.) P. Kumm (čirůvka bílá)



Obrázek 11: *Tricholoma album* (Schaeff.) P. Kumm (Junek², 2005)

Klobouk 5-12 cm široký, nízce vyklenutý, široce tupě vyhrblý, okraj dlouho podvinutý, pokožka bílá, později nažloutlá, hedvábitě lesklá, uprostřed někdy nahnědlá. Lupeny vykrojené, zoubkem přirostlé, mírně husté, bílé, pak krémově nažloutlé, dosti tlusté. Třeň je válcovitý, dole obvykle zahnutý, bílý s růžovým nádechem, nahoře jemně zrnčkatý, 6-8 cm x 1-1,5 cm. Dužnina bílá, neměnná, dost tuhá, moučného, později nepříjemného pachu a nahořklé, mírně palčivé chuti. Vyskytuje se roztroušeně v listnatých a smíšených lesích, hlavně pod břízami a duby, také v alejích na písčitých a jílovitých půdách. Nejedlá (Erhartovi, 1995; Keizer, 1998; Svrček, 1997).

Druh: *Tricholoma sejunctum* (Sowerby) Qué. (čirůvka odlišná)



Obrázek 12: *Tricholoma sejunctum* (Sowerby) Qué. (Véle, 2006)

Klobouk má v průměru 3-10 cm, zpočátku polokulovitě vyklenutý s podvinutým okrajem, později plošně sklenutý a vyhrblý, žlutavý nebo zelenavý, na středu zahnědlý, za vlhka lepkavý. Lupeny jsou husté, bělavé, na ostří zažloutlé. Třeň je válcovitý, dole často ztlustělý, bělavý, plný. Dužnina je bílá, pod pokožkou klobouku slabě nažloutlá, neměnná, chuť a vůně okurkově moučná, slabě nahořklá. Roste v srpnu až říjnu v listnatých i smíšených lesích. Je nejedlá (Erhartovi, 1995).

Rod: *Tricholomopsis* (šafránka)

Druh: *Tricholomopsis decora* (Fr.) Sing. (šafránka ozdobná)



Obrázek 13: *Tricholomopsis decora* (Fr.) Sing. (Komár, 2009)

Klobouk o průměru 4-9 cm je zprvu sklenutý až nízce sklenutý, pak plochý, na středu někdy až vmáčklý, tence masitý, na zlatě žlutém podkladě olivově hnědě až olivově černě šupinkatý, na středu jsou šupinky nejhustší. Lupeny jsou 3-8 mm široké, středně husté, u třeně zoubkem vykrojené, sytě žluté, s rovným ojíněným ostřím.

Třeň je 5-8 cm dlouhý, 7-12 mm široký, válcovitý, zakřivený, plný, v dospělosti dutý, šupinkatý až vláknitý, na vrcholu v mládí bělavý, jinak celý žlutý. Dužnina je pružná, tenká, žlutá, na vzduchu nemění barvu. Má slabou nahořklou chuť a nenápadnou vůni. Roste v červnu až říjnu na trouchnivějícím dřevě jehličnatých stromů jednotlivě nebo v malých trsech. Je nejedlá (Erhartovi, 1995; Škubla, 2007).

2. CHEMICKÁ SKLADBA HUB

2.1 Úvod

Všem houbám je společné, že nemají listovou zeleň (chlorofyl) jako zelené autotrofní rostliny. Proto nejsou schopny vytvářet z jednoduchých minerálních látek pomocí sluneční energie organickou hmotu svého těla. Vyživují se heterotrofně. V první řadě jde o saprofytický, v druhé o parazitický způsob života.

Charakteristickou složkou buněčných stěn všech vláknitých hub je chitin, s výjimkou oomycetů, které mají celulózu. Zažívacími šťávami člověka je téměř neporušitelná. Obsah chitinu sice způsobuje těžkou stravitelnost některých druhů hub, podporuje však střevní peristaltiku a přispívá k lepšímu trávení.

Plazma houbových buněk obsahuje především vodu, bílkoviny, menší množství cukrů (mannan, glukan) a tuků, minerální látky (draslík a fosfor) a řadu dalších látek, kterými jsou např. izoprenoidní lipidy (terpeny, steroidy aj.), aromatické sloučeniny (chinony aj.), alkaloidy, kyseliny a látky, které se podílejí na charakteristických vůních a chutích, jimiž houbové plodnice často oplývají. Dále houby obsahují sloučeniny hořčíku, železa a stopy fluoru, mědi, manganu, kobaltu, titanu, ale i olova. Obsah těchto látek stoupá se stářím plodnice. (Semerdžieva, 1986; Smotlacha, 1999).

Významnou úlohu ve fyziologii houbové buňky hrají enzymy, které umožňují rozklad a využívání substrátu.

Cukry tvoří až 6 % hmotnosti, a to jednak jako složky buněčných stěn, jednak jako zásobní cukry obsažené v plazmě. Z glukanů jsou to glykogen, dále mannany, galaktany, mannit, trehalosa a ribosa, doprovázené cukernými alkoholy volemitolem, sorbitolem, erythritolem, arabitolem a některými dalšími cukry. Tuků tvoří běžně pod 1 % hmotnosti, někdy však i více. Mají především úlohu zásobních látek. Jsou to zejména glyceridy, glykolipidy, lipoproteiny, fosfolipidy, steroidy aj. Jen v malém množství (0,3 – 3,5 %) jsou v houbách přítomny aminokyseliny, peptidy a bílkoviny. Z uvedeného vyplývá, že vzhledem k poměrně nízkému obsahu cukrů, tuků a zejména bílkovin nelze jedlé houby pokládat za živinu, nýbrž spíše za pochutinu. Energetický obsah mají houby velmi nízký pro malý obsah tuků. 100 g čerstvých hub dodá organismu maximálně 30-140 kJ (denní potřeba je asi 12 000 kJ). Houby se dají v tomto směru srovnat se zeleninou, jsou velmi dietetické. Četné druhy hub obsahují

další látky, např. vitamíny, které mohou být žádoucím doplňkem lidské výživy. Do této skupiny látek patří též karotenoidy, z nichž vzniká vitamín A, které jsou v malém množství obsaženy v řadě makromycetů (Kovář, 1999; Semerdžieva, 1986).

Důležitými látkami přítomnými v houbách jsou houbové toxiny a různé látky s léčivými účinky (Semerdžieva, 1986).

2.2 Primární metabolity

2.2.1 Bílkoviny

Základ bílkovinných molekul tvoří peptidy skládající se z aminokyselin. Houby obsahují dvacet základních aminokyselin, které buňka tvoří z jednoduchých uhlíkatých a dusíkatých komponent, stejně jako cévnaté rostliny. Tím se liší od lidí, kteří musí osm esenciálních aminokyselin přijímat z potravy. Aminokyseliny jsou nezbytné pro syntézu bílkovin (Klán, 1989).

Obsah bílkovin, důležitých stavebních látek pro tělo, kolísá u různých druhů hub od 8 do 36 %. To ale platí pro sušinu z hub. Čerstvá houba má až 90 % vody, a proto obsahuje bílkovin méně, než jsou uvedená čísla. Odtud možná pochází omyl, že houby obsahují množství bílkovin srovnatelné s masem, které má až 33 g bílkovin na 100 g hmotnosti. Ve skutečnosti houby obsahují v průměru sotva 1/3 bílkovin oproti masu. Ale i to je stále nezanedbatelné množství. Některé druhy mají zvýšený obsah chitinu, což ztěžuje využití bílkovin pro metabolismus člověka (Kovář, 1999).

Esenciálních aminokyselin nezbytných pro člověka obsahují houby v sušině 2,6-7,6 %. Nejvíce je leucinu a lysinu, nejméně je methioninu. Značná část aminokyselin (25-35 %) je ve volném stavu a není tedy vázaná v bílkovinách jako u rostlin (Klán, 1999).

2.2.2 Lipidy

Množství tuků v sušině hub je minimální – asi 3 %. Většina lipidů jsou triacylglyceroly, které nazýváme tuky. Tuky se vyskytují ve formě větších či menších kapiček (triglyceridů) nebo krystalků (ergosterolu) rozptýlených ve vakuolách nebo zabudovaných do funkčních struktur. Tuky mohou v buňce sloužit jako zásobní látky s vysokou energetickou hodnotou nebo se mohou

uplatňovat v metabolických procesech spolu s jinými látkami jako přenašeči, také mohou být projevem degenerace buňky. Mastné kyseliny potřebné na stavbu tuků vznikají v buňce kondenzací acetylových jednotek.

Fosfolipidy jsou látky, které mají v molekule alkoholovou skupinu glycerolu esterifikovanou kyselinou fosforečnou, na ni je navázána dusíkatá složka např. cholin v lecitinu, etanolamin v kefalínu apod. Fosfolipidy jsou velmi důležitou složkou buněčných membrán hub, protože umožňují jejich propustnost a elasticnost vzhledem k volnému propojení molekul. Mastné kyseliny obsažené v houbách (např. kyselina linolová) jsou pro člověka velmi důležité (Klán, 1989; Kovář, 1999).

2.2.3 Sacharidy

V houbové sušině je 20-30 % sacharidů. Jsou to pentosy (xylosa, ribosa), metylpentosy (rhamnosa a fukosa), hexosy (glukosa, galaktosa, mannosy), cukernaté alkoholy (mannitol a inositol), uronové kyseliny (galakturonová a glukronová), disacharidy (sacharosa). Nejvyšší obsah tvoří mannitol (9-13 %). „Houbový cukr“ – disacharid trehalosa – se vyskytuje ve vyšším množství jen v mladých plodnicích, v dospělých je ho již méně nebo není obsažen vůbec, neboť je hydrolyzován na glukosu (Klán, 1999).

Polysacharidy jsou součástí buněčné stěny hub. Mezi nejdůležitější patří chitin, chitosan, glukany, galaktany, kyselina polygalakturonová, mannany a vzácně celulóza. Uvnitř buněk je jako zásobní látka glykogen. Polysacharidy se vyskytují též ve vazbě s proteiny či lipidy a tvoří tak glykoproteiny, glykolipidy, lipopolysacharidy a polysacharidové proteiny.

Chitin (poly- β 1 \rightarrow 4-N-acetyl-D-glukosamin, 7,5 %) je tvořen dlouhým řetězcem N-acetyl-D-glukosaminových jednotek vázaných β 1 \rightarrow 4 vazbami.

Glukany (8 %) jsou větvené polymery glukosy (β 1 \rightarrow 3-glukanu, β 1 \rightarrow 6-glukanu, β 1 \rightarrow 4-glukanu) spojené glykosidickými vazbami. Některé glukany tvoří s jódem komplexní sloučeninu, která má modré zbarvení (tzv. amyloidní reakce buněčných stěn výtrusů např. holubinek, ryzců, tmavobělek a některých hyf). Aby nastala reakce, musí mít přítomný polysacharid nevětvený řetězec s více než šesti glukosovými jednotkami a musí být stočený do šroubovice. Pouze tyto šroubovice mají schopnost absorbovat jód. Krátké boční větve šroubovitě stočené rovněž jód

absorbují, ale vzniká jen hnědé zabarvení (tzv. dextrinoidní reakce stěn výtrusů většiny bedel, žampionů a některých hřibovitých).

Glykogen (5 %) a trehalosa jsou zásobními sacharidy v houbové buňce. Glykogen se skládá z glukosových jednotek uspořádaných do řetězce a spojených vazbami $\alpha 1 \rightarrow 4$ a $\alpha 1 \rightarrow 6$. Předpokládá se, že biosyntéza je shodná s živočišnými buňkami. Trehalosa je transportní disacharid složený ze dvou jednotek glukosy. Někdy je trehalosy tak malé množství, že ji nelze dokázat. Např. v plodnicích lupenatých hub byla nalezena jen v mládí, u dospělých plodnic se zřejmě nevytváří (Klán, 1989).

2.2.4 Enzymy

Houby také slouží při výrobě enzymů – syřidel, které srážejí bílkoviny v mléce na tvaroh. Houby umožňují vzniknout lahodným jogurtům, kefirům, kysanému mléku. Jogurtové kultury se skládají z několika druhů mléčných kvasinek a laktobakterií, kterým říkáme acidofilní. Acidofilní není tudíž mléko, ale bakterie (Kovář, 1999).

2.3 Sekundární metabolity

2.3.1 Úvod

Sekundární metabolity vznikají jako přímé produkty metabolismu a nijak významně se nezúčastňují základních metabolických drah. Jde o velmi rozmanité druhy látek, z nichž nejznámější jsou alkaloidy, antibiotika, indolové deriváty, steroly, terpeny, pohlavní hormony, deriváty pyridinu či látky odvozené od běžných aminokyselin. Dnešní chemie u hub klasifikuje téměř čtyřicet typů sekundárních metabolitů a až tisíc těchto sloučenin. Ústřední roli při jejich syntéze hraje acetylkoenzym A. Přímými výchozími látkami jsou sacharidy, aromatické aminokyseliny, kyselina mevalonová, kyselina šikimová a mastné kyseliny.

Sekundární metabolity se dlouho považovaly za odpadní produkty při metabolismu, zvláště když bylo zřejmé, že pro růst organismu nejsou nezbytné. V některých případech jsou produkovány jen určitými kmeny daného houbového druhu. Jiné kmeny morfologicky i fyziologicky shodné jmenované látky neprodukují.

Po určité době může dojít i ke ztrátě schopnosti produkovat daný metabolit. Tato ztráta může být jen přechodná. Současné názory z hlediska chemické ekologie přinášejí poučení o významu těchto látek pro houbu, tj. pro její schopnost přizpůsobovat se životním podmínkám prostředí a dokonce pro nalezení prostředků nezbytných k jejich přežití či ochraně. Současný výklad lze shrnout v tezi, že mutací získaná syntéza nového sekundárního metabolitu představuje významnou událost vedoucí k produkci životně důležité biologicky aktivní látky, která ve svých důsledcích vylepšuje naději na přežití druhu.

Sekundární metabolity na rozdíl od primárních jsou specifické pro jednotky různých taxonomických úrovní (druh, rod, čeleď). Lze jich proto často využívat pro chemické určování a klasifikaci hub (chemotaxonomii). Pro sekundární metabolity je příznačné, že jsou často značně toxické již ve velmi nízkých koncentracích. Jedná se například o amanitiny obsažené v muchomůrce zelené, aflatoxiny produkované některými kmeny kropidláku žlutého, peniciliny produkované štětičkovcem žlutozeleným, kyselina lysergová produkováná pyrenomycety paličkovice nachové a *Claviceps paspali*. Pro sekundární metabolity je příznačné široké využití v humánní a veterinární medicíně (ergotové alkaloidy z rodu *Claviceps*, fumigatin a fumagilin z *Aspergillus fumigatus*, griseofulvin z *Penicillium patulum*, *P. griseofulvum* a *P. nigricans*, cefalosporin z druhu *Emericellopsis minimum*) (Klán, 1989).

2.3.2 Vitaminy

Obsah vitaminů v houbách je daleko vyšší než se všeobecně soudí. Bohužel některé vitaminy se však varem ničí. Jsou to jak ve vodě rozpustné vitaminy C, B₁, B₁₂, kyselina listová, tak vitamin K, který je rozpustný v tucích. Houby obsahují hlavně vitaminy skupiny B (B₁, B₂, B₅, B₁₂), C, D, E a K. Např. vitaminu B₅ mají houby 5krát více, než je průměr u zeleniny (Kovář, 1999).

2.3.3 Pigmenty

Barva je znak, který hraje důležitou roli při určování hub, zvláště makromycetů, i když jde z hlediska stálosti o znak velice proměnlivý.

Každý druh vytváří svoje typické barvy, ale výsledná barva houby je značně ovlivněna různými přírodními faktory jako je stanoviště, výživa, světelné podmínky, teplota, vlhkost, stáří podhoubí nebo plodnice aj. (Kovář, 1999; Keizer, 1998).

Zbarvení plodnic i myceliových kultur hub je způsobeno chemickými látkami – pigmenty, jejichž syntéza probíhá většinou na šikimátové, acetát-malonárové a mevalonátové metabolické dráze (jde tedy vesměs o sekundární metabolity).

Pigmenty mohou být lokalizovány v buňce jako tzv. chromoforní pigmenty nebo jsou vyloučeny mimo buňku a pak mluvíme o chromoparních neboli mimobuněčných pigmentech (tyto pak mohou zbarvovat živné médium, dřevo apod.) Chromoforní pigmenty mohou být obsaženy jak v cytoplazmě, tak ve vakuolách nebo je lze najít ve formě spirál, prstenců a zrněk na vnitřní části buněčné stěny (epimembranózní pigmenty). O nekropigmentech mluvíme, když se plodnice po usušení zbarví tmavě až černě. Pigmenty se nejlépe lokalizují mikroskopicky za použití speciálních barvicích technik.

Nejvíce pozornosti poutají houby, které změni barvu po rozříznutí, otlacení nebo poškrábání. Ke změně barvy dojde často během několika sekund. Nejčastější je zmodrání, zčernání, zčervenání a zežloutnutí. Podstata všech barevných změn spočívá v tom, že k pigmentům v plodnici se dostane kyslík. Oxidací za katalýzy enzymů fenoloxidáz se změni pigment v jinou barevně odlišnou formu (Klán, 1989).

Biologický význam barev není zatím přesně znám, ale je zajímavé, že například parazitní houby se barvou přizpůsobují kvalitě půdního substrátu nebo hostitelského stromu či dřeviny. Chemické složení pigmentů hub je u každé houby jiné nebo je stejné jen u několika druhů. Některá houbová barviva se používají k barvení látek nebo k moření dřeva (Kovář, 1999).

2.3.4 Vůně a pachy hub

Vůně a pachy hub jsou výrazem chemického složení houby a jsou poměrně stálé. Proto u lidí s dobrým čichem jsou význačnou pomocí při určování hub a zkušený houbař některé druhy hub pozná podle pachu i se zavřenýma očima. Nejčastější je tzv. houbová vůně, u které se dosud nepodařilo vypátrat, jaká chemická sloučenina ji způsobuje. Mnohé vůně a pachy připomínají některé chemické sloučeniny a mnohdy také tyto chemické látky jsou skutečně v houbách obsaženy. Slovně nelze však tyto vůně a pachy nějak vyjádřit, děje se to tedy pouze přirovnáváním k vůni nebo

zápachu jiných známých látek. Velmi častou vůní u hub je tzv. okurková nebo moučná vůně, která nám mnoho napomáhá k rozlišení některých podobných druhů hub. K příjemným pachům hub patří vůně ovocná, bylinná a kořená. (Příhoda, 1988).

2.3.5 Chut'ové látky hub

Podobně jako rozmanité pachy hub, je i chuť dužniny, popřípadě mléka hub, výrazem určitých chemických vlastností i pomůckou při jejich určování. Základní význam má pak chuť pro zužitkování hub k jídlu. Chuť jedlých hub se označuje jako mírná, nasládlá, sladká, oříšková. Houby s chutí nakyslou, natrpklou, škrablavou, svíravou už nejsou chutné a s chutí štiplavou, mírně nebo značně palčivou, nahořklou až hořkou se označují většinou jako nejedlé.

Chuť ale není rozhodujícím znakem pro to, zda je houba jedlá nebo jedovatá. Příjemně chutnající houby mohou být smrtelně jedovaté, kdežto jiné houby v čerstvém stavu s chutí značně nepříjemnou mohou být po určité úpravě jedlé a docela chutné (Příhoda, 1988).

2.4 Minerální látky a voda

Na minerální látky jsou houby zvláště bohaté. Nejvíce jsou zastoupeny prvky draslík, fosfor a sodík, méně vápník, železo a měď. Nepříjemnou vlastností hub je vstřebávání těžkých kovů ze znečištěného prostředí (olovo, rtuť, kadmium). Koncentrace stopových prvků v plodnicích hub závisí na stanovišti. Pozoruhodné jsou relativně vysoké hodnoty obsahu rtuti (až 150 mg v 1 kg sušiny u pečárek) a rubidia (až 400 mg v 1 kg sušiny u klouzků) u všech hub. Množství prvku v plodnici závisí na schopnosti druhu daný prvek hromadit a na obsahu prvku v půdě.

Čerstvé plodnice obsahují v průměru 90 % vody, což je srovnatelné jediné s ovocem (Klán, 1990; Kovář, 1999; Svrček, 1997).

2.5 Látky izolované z testovaných rodů hub

U druhů *Amanita crocea*, *Bolbitius vitellinus*, *Cortinarius traganus*, *Cystoderma terrei*, *Hebeloma circinans*, *Hygrophorus pratensis*, *Psathyrella multipedata*, *Rhodocybe gemina*, *Tricholoma album*, *Tricholoma sejunctum* a *Tricholomopsis decora* zatím nebyly izolovány čisté látky. U druhu *Oudemansiella mucida* byl izolován mucidin s antifungálním účinkem (Von Jagow, 1986) a u druhu *Lycoperdon pyriforme* byl izolován 4-methoxy-benzen-1-azoformamid; 4-methoxybenzen-1-ONN-azoxyformamid; 3,5-dichloro-4-methoxybenzen-1-ONN-azoxyformamid (Koepcke, 1999).

Látky izolované z rodů hub, do nichž patří testované druhy, jsou uvedeny v tabulce 1. Z rodu *Bolbitius* zatím nebyly čisté látky izolovány.

Tabulka 1: Látky izolované z testovaných rodů hub

Rod	Izolované látky	Citace
<i>Amanita</i>	cyklické peptidy (amatoxiny, falotoxiny, virotoxiny) - α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, ζ -amanitin, amanullinová kyselina, amanullin, falacidin, falacin, falisin, faloidin, viroidin, S-deoxiviroidin, virotoxin, S-deoxivirotoxin; ibotenová kyselina, muscimol, muskazon, stizolobová kyselina, muskarin	Hrdina, 2004
<i>Cortinarius</i>	kortinarin A, kortinarin B, orelanin, orelin, orelinin	Hrdina, 2004
	kortinarin C	Tebbett, 1986
<i>Cystoderma</i>	fenolické antioxidanty – butylovaný hydroxyanisol, butylovaný hydroxytoluen a Pr gallát	Giridhar, 2001
<i>Hebeloma</i>	hebelophyllen G, H, alloaromadendran, hebelodendrol	Wichlacz, 1999
	lanostanové triterpeny - hebelomová kyselina B, E, F	Garlaschelli, 1995
	hebelomová kyselina A, H, I	Dossena, 1996
	sesquiterpeny - (E)-2,3-epoxy-2,6-dimethyl-10-methylene-6,11-dodecadiene, (3S)-(E)-2,6-dimethyl-10-methylene-1,6,11-dodecatrien-3-ol	Bocchi, 1992
	triterpenové glykosidy - hebevinosid XII, XIII, XIV	Fujimoto, 1991
<i>Hygrophorus</i>	chrysotrión A, B	Gilardoni, 2007
	osm mastných kyselin (C16,C18) – kys.(2E,9E)-4-oxooctadeca-2,9,17-trienová, kys. (2E,11Z)-4-oxooctadeca-2,11,17-trienová, kys. (E)-4-oxohexadeca-2,15-dienová, kys. (E)-4-oxooctadeca-2,17-dienová, kys. (2E,9E)-4-oxooctadeca-2,9-dienová, kys. (2E,11Z)-4-oxooctadeca-2,11-dienová, kys. (E)-4-oxohexadec-2-enová, kys. (E)-4-oxooctadec-2-enová	Teichert, 2005
<i>Lycoperdon</i>	4-methoxy-benzen-1-azoxyformamid; 4-methoxybenzen-1-ONN-azoxyformamid; 3,5-dichloro-4-methoxybenzen-1-ONN-azoxyformamid	Koepcke, 1999
<i>Oudemansiella</i>	Mucidin	Von Jagow, 1986

Rod	Izolované látky	Citace
<i>Psathyrella</i>	Psathyrella velutina lectin (PVL)	Yan, 2009
	monoterpenový lakton – scobinolid	Gadir, 1986
	pleuromutilin, 14-acetylmutilin, pleuromutilin-22-xylosid	Palma, 1984
<i>Rhodocybe</i>	pleuromutilin, 14-acetylmutilin, pleuromutilin-22-xylosid	Palma, 1984
<i>Tricholoma</i>	p-hydroxybenzoová kyselina	Ribeiro, 2006
	(22E,24R)-ergosta-7,22-diene-3 β ,5 α ,6 β -triol	Hata, 2002
	flavomannin-6,6'-dimethylether	Pachon-Pena, 2009
	indolové sloučeniny - tryptofan, tryptamin, serotonin	Muszynska, 2009
	fenolické sloučeniny - orirubenon A, B, C	Kawagishi, 2004
	orirubenon D, E, F, G	Sakai, 2005
	antifungální protein – trichogin	Guo, 2005
	triterpeny - trichomycin A, B	Ovenden, 2005
	diterpeny - tricholomalid A, B, C	Tsukamoto, 2003
	tricholomenyn C, D, E	Garlaschelli, 1996
	C-30 terpenoidy - saponaceolid B, C, D	De Bernardi, 1991
	tricholidová kyselina	Nozoe, 1982
	trans-2-nonenal	Woos, 1994
	indolové deriváty - 2,4-dimethylindol, 4-hydroxymethyl-2-methylindol, 4-methoxymethyl-2-methylindol	Garlaschelli, 1994
<i>Tricholomopsis</i>	neproteinové aminokyseliny acetylenového typu, kys. pipekolová	Niimura, 1974
	kys. šťavelová, citronová, jablečná, chinová a fumarová	Ribeiro, 2006
	steryl estery - 3 β ,5 α -dihydroxy-(22E,24R)-ergosta-7,22-dien-6 β -yl oleát a 3 β ,5 α -dihydroxy-(22E,24R)-ergosta-22-en-7-one-6 β -yl oleát	Wang, 2005
	glutamylpeptidy - γ -glutamyl-L-2-aminoheks-4-ynoic acid, γ -L-glutamyl-L-erythro-2-amino-3-hydroxyheks-4-ynoic acid	Niimura, 1977
	L-2-aminoheks-4-ynoic acid, L-2-amino-3-hydroxyheks-4-ynoic acid (threo a erythro), L-3-(3-carboxy-4-furyl)alanin	Hatanaka, 1976
	L-3-(4-carboxy-3-furyl)alanin	Hatanaka, 1975

3. ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

3.1 Volné radikály a antioxidanty

3.1.1 Volné radikály

Volné radikály (VR) jsou látky schopné samostatné existence (atomy, molekuly, ionty), které mají ve svém elektronovém obalu nepárový elektron, event. více nepárových elektronů (Racek, 2003).

Volný radikál z normálních molekul vzniká trojím způsobem: homolytickým štěpením kovalentní (dvoelektronové) chemické vazby, přičemž každý fragment získá jeden nepárový elektron. Dále přidáním jednoho elektronu k normální molekule – redukcí, nebo naopak ztrátou jednoho elektronu, což je oxidace. K homolytickému štěpení je třeba hodně energie, například vysoká teplota, ultrafialové nebo ionizační záření. V biologických systémech však volné radikály vznikají energeticky snadnějším způsobem – odejmutím nebo přijetím elektronu. Radikály mohou být neutrální částice nebo záporně či kladně nabitě ionty (Štípek, 2000).

Protože stabilní konfigurace vyžaduje párové seskupení elektronů, snaží se volné radikály chybějící elektron doplnit. Z toho plyne malá stabilita a vysoká reaktivita většiny volných radikálů. Volný radikál získá chybějící elektron, setká-li se s jiným radikálem, častěji však vytržením elektronu ze „zdravé“ molekuly. Z té se pak stává radikál a může napadnout jinou sloučeninu, přeměnit ji na radikál atd. Nastartuje se tak řetězová reakce vedoucí k poškození řady molekul. Řetězová reakce je ukončena, setkají-li se dva radikály. Obvykle však tehdy, setká-li se radikál s látkou, jejíž radikál je stabilní a může delší dobu přetrvávat. Protože ztráta elektronu je z elektrochemického hlediska oxidace, mají volné radikály oxidační účinek (Racek, 2003).

Poslední výzkumy považují působení volných radikálů a poškození v organismu, způsobené nadměrnou oxidací, za příčinu vzniku mnoha degenerativních chorob.

Volné radikály ale nemají vždy pouze záporné účinky. Náš organismus je denně vytváří, aby bojovaly s cizími buňkami, hrají také roli při základních chemických reakcích v chodu metabolismu nebo při využití kyslíku k tvorbě energie. Tím plní důležitou úlohu při správném fungování našeho organismu. Obtíže vznikají, vytvoří-li se volných radikálů v těle nadbytek. Všechny radikály, které se tvoří uvnitř

organismu, pocházejí z tzv. endogenních (vnitřních) zdrojů. Vedle nich existují ještě zdroje exogenní, které se tvoří v okolí, jež nás obklopuje. Příčinou jejich vzniku je zamořené ovzduší, toxické chemické sloučeniny, závislost na lécích, fyzický a psychický stres, tabák, vystavování organismu různým druhům záření, nevhodná skladba stravy, přílišné vystavování se slunečním paprskům apod. (Ortembergová, 2003).

3.1.2 Reaktivní radikálové molekuly v organismu a typy radikálových forem

Jedná se o látky, které velmi rychle reagují s různými biologickými strukturami, ke kterým patří mastné kyseliny, lipidy, aminokyseliny, proteiny, mononukleotidy, polynukleotidy i s řadou dalších nízkomolekulárních metabolitů, jež jsou součástí živé hmoty.

Reaktivní formy kyslíku a dusíku se dělí na dvě skupiny, a to na skupinu volných radikálů a skupinu látek, které nejsou radikály.

K volným radikálům reaktivních forem kyslíku patří: superoxid ($\bullet\text{O}_2^-$), hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$), peroxy ($\bullet\text{ROO}$), alkoxy ($\bullet\text{RO}$), hydroperoxy ($\bullet\text{HO}_2$). K látkám, které nejsou volné radikály a patří ke skupině reaktivních forem kyslíku, řadíme: peroxid vodíku (H_2O_2), kyselinu chlornou (HOCl), ozon (O_3), singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). Volné radikály reaktivních forem dusíku jsou: oxid dusnatý ($\bullet\text{NO}$), oxid dusičitý ($\bullet\text{NO}_2$). K látkám, které nejsou volné radikály a patří ke skupině reaktivních forem dusíku, řadíme: nitrosyl (NO^+), nitroxid (NO^-), kyselinu dusitou (HNO_2), oxid dusitý (N_2O_3), oxid dusičitý (N_2O_4), nitronium (NO_2^+), peroxyinitrit (ONOO^-), alkylperoxyinitrit (ROONO) (Kameníková, 2000/2001).

3.1.3 Mechanismus poškození tkáně

Volné radikály tvořící se v organismu působí na tři hlavní cílové struktury v buňce: nenasycené mastné kyseliny v lipidech, proteiny a DNA. U nenasycených mastných kyselin dochází ke ztrátě dvojných vazeb a k tvorbě reaktivních metabolitů (peroxydy, aldehydy), což vede ke změně fluidity lipidů, ke změně v propustnosti membrán a k významnému vlivu na membránově vázané enzymy. Působením volných radikálů na proteiny dochází k jejich agregaci a síťování, k fragmentaci

a štěpení, k modifikaci thiolových skupin a benzenových jader aminokyselin v proteinech a k reakci s hemovým železem. Následkem jsou pak změny v transportu iontů, dochází ke vstupu vápenatých iontů do cytosolu a ke změnám v aktivitě enzymů. Poškození vůči DNA vlivem volných radikálů vede ke štěpení bazí, ke zlomům nukleotidových řetězců a ke křížové vazbě řetězců. Následkem těchto změn jsou mutace, translační chyby a inhibice proteosyntézy řízené DNA (Kameníková, 2000/2001).

3.1.4 Antioxidační ochranný systém

Vznik oxidačního stresu vede k indukci antioxidační obrany. Antioxidanty se vyplavují např. z jater, tukové tkáně, dochází také k aktivaci jejich syntézy. Oxidační stres může nejprve způsobit nepozorované poškození tkání, teprve později může dojít k jejich zřetelnému poškození. Podle typu, účinku látky a z ní generovaného volného radikálu může dojít k různým způsobům poškození:

- toxin samotný je volným radikálem a vyvolává lipoperoxidaci (radikál notrodioxidový)
- toxin je metabolizován na volný radikál (tetrachlormetan, penicilamin, fenylbutazon)
- toxin generuje volné radikály (alloxan, doxorubicin, paraquat)
- toxin vyčerpává antioxidační obranu organismu (paracetamol)

Souhrnně lze říci, že zvýšená tvorba volných radikálů spolu se změnami antioxidačních systémů vede ke stavu tzv. oxidačního stresu, projevujícího se zvýšenou lipoperoxidací, zvýšením obsahu volného železa uvnitř buněk, deplecí glutathionu (GSH), jejichž výsledkem je snížení intracelulárního obsahu GSH a poškození lipidů, proteinů a DNA, jak bylo výše vysvětleno. Tyto čtyři změny vedou k poškození buněčné membrány, jako nezbytné strukturální složky buněk vlivem peroxidace lipidů a ke zvýšení intracelulárního obsahu koncentrace vápenatých iontů (Kameníková, 2000/2001).

3.1.5 Negativní vliv volných radikálů

Nahromadění volných radikálů vede obecně k procesům stárnutí, k rozvoji diabetes mellitus, nádorového onemocnění, k rozvoji autoimunitního poškození,

radiačního, ischemického i toxického poškození (vliv alkoholu, kouření, znečištěného ovzduší, vliv chemických látek tvořících v organismu radikály při své přeměně aj.).

Vezmeme-li v úvahu jednotlivé orgány či systémy, literatura uvádí, že v případě jater se radikálové působení podílí na toxickém poškození jater, alkoholovém poškození, na rozvoji hepatitidy a idiopatické hemochromatóze. V nervovém systému se připisuje jejich vliv při rozvoji Parkinsonovy nemoci, sklerózy multiplex, Alzheimerovy nemoci, demyelinizační nemoci. Jejich vliv spočívá také u hypertenzního cerebrovaskulárního poškození, ve svalovém systému se volné radikálové molekuly podílejí na rozvoji svalové dystrofie, v gastrointestinálním traktu na rozvoji peptického vředu, pankreatitidy a Crohnovy nemoci, u ledvin při rozvoji glomerulonefritidy, nefrotického syndromu, urémie. Dále se volné radikálové molekuly podílejí na ischemicko-reperfučním poškození kardiovaskulárního systému, na rozvoji aterosklerózy a infarktu myokardu.

Vzhledem k tomu, že oxidačním stresem označujeme reakce vyvolané působením radikálů v organismu, pak ke stavu, označeném jako oxidační stres buněk a tkání, může dojít pouze ze dvou příčin. Jednou z nich je zvýšená tvorba volných radikálů v těle a další je nedostatečná antioxidační ochrana organismu (Kameníková, 2000/2001).

3.1.6 Antioxidanty

Antioxidanty lze rozdělit podle různých kritérií. Podle jejich fyzikálních vlastností, a to rozpustnosti ve vodě nebo v lipidech, rozeznáváme antioxidanty hydrofilní, lipofilní a amfofilní. Tato jejich vlastnost je rozhodující pro průnik buněčnými membránami. Podle jejich buněčné lokalizace rozlišujeme antioxidanty extracelulární, intracelulární a ty, které jsou lokalizovány v buněčných membránách. Podle jejich původu je známe jako antioxidanty endogenní (organismus je schopen jejich tvorby) a exogenní. Podle jejich chemické struktury je známe jako antioxidanty enzymové a neenzymové, dále pak rozeznáváme látky s účinkem redukčním, látky schopné tvorby chelátů, látky inhibující enzymy, které katalyzují tvorbu volných radikálů.

Intracelulární antioxidanty rozdělujeme na dvě skupiny: enzymy a neenzymové látky.

K enzymům, které se uplatňují při ochraně buňky před volnými radikály, patří superoxiddismutasa (SOD), glutathionperoxidasa (GPx) a katalasa (CAT).

K intracelulárním neenzymovým antioxidačním látkám patří především redukovaný glutathion GSH. Intracelulární neenzymovou antioxidační látkou s velkým významem pro organismus je stopový prvek selen, který je součástí enzymu glutathionperoxidasy. Aktivita enzymu GPx významně klesá při jeho velkém nedostatku v organismu. Mezi vysokomolekulární endogenní antioxidanty patří transferin, laktoferin, feritin, haptoglobin, hemopexin, albumin. K nízkomolekulárním endogenním antioxidantům patří askorbát (vitamin C), α -tokoferol a vitamin E, ubichinon/ubichinol (koenzym Q), karotenoidy, β -karoten a vitamin A, thioly a disulfidy (glutathion, kyselina lipoová), melatonin, kyselina močová (urát), bilirubin (Kameníková, 2000/2001; Štípek, 2000).

Jestliže antioxidační kapacita organismu nestačí, dochází k poškození volnými radikály (Kameníková, 2000/2001).

3.1.7 Terapeutické možnosti

Při porušené rovnováze mezi prooxidanty a antioxidanty je nutné si uvědomit, že antioxidanty obvykle chrání organismus pouze před určitými typy volných radikálů. Organismus před působením superoxidových iontů bude chráněn superoxiddismutasou, avšak vůči hydroxylovému radikálu je tento enzym neúčinný. Chceme-li zvýšit antioxidační kapacitu organismu, pak se obvykle v terapii používá směs antioxidantů. Antioxidanty se mohou v organismu regenerovat řadou látek včetně jiných antioxidantů. Takovými látkami může být např. vitamin C nebo koenzym Q₁₀, které regenerují α -tokoferol rychle se vyčerpávající v průběhu oxidačního stresu v lipofilním kompartmentu (Kameníková, 2000/2001).

3.1.8 Látky přírodního původu působící antioxidačně

V posledních letech vzrůstá zájem lidí o účinné látky, které nám poskytuje příroda. Fytofarmaka nabývají stále většího významu ve zdravotní péči. Ale nedůvěra ze stran lékařů vychází jednak z převahy nabídek léčiv chemického charakteru, dále z chybné domněnky, že léčení „drogami“ patří spíše tzv. empirickému fytoterapeutovi, tj. léčiteli. A také zde hraje svou roli i výskyt mnoha

chemicky nejednotných účinných látek v rostlině a nestandardnost jejich obsahu v rostlinném materiálu. Novými analytickými přesnými metodami lze i tyto poslední výhrady vyloučit a přípravky z rostlinného materiálu přesně na účinnou látku standardizovat.

K přírodním látkám, které přijímá naše tělo, patří vedle extraktů a jiných farmaceuticky zpracovaných rostlin, především potrava. V potravě se vyskytuje celá řada antioxidačně působících látek, které zabraňují vzniku a množení volných kyslíkových radikálů v těle, jako je např. katorenoidy (β -karoten), tokoferoly (vitamin E), kyselina askorbová (vitamin C), bioflavonoidy, selen, flavonoidy, silymarin, ginsenoidy (Kameníková, 2000/2001).

3.2 Stanovení antioxidační aktivity

3.2.1 Stanovení antioxidační aktivity

Při oxidačních procesech probíhajících v živých organismech se tvoří vysoce reaktivní volné radikály. Tyto volné radikály urychlují stárnutí buněk a zvyšují riziko poškození zdraví a také iniciují vznik rakoviny. Antioxidanty jsou chemické sloučeniny schopné ukončit radikálové řetězové reakce.

V posledním desetiletí probíhá rozsáhlý výzkum rostlin a hub, které je možné použít jako zdroj účinných sloučenin zhašejících volné radikály. Existuje několik detekčních systémů založených na redoxních reakcích jako je:

- inhibice chemiluminiscence luminolu nebo tetralinu
- inhibice tvorby thiokyanátu železitého
- odbarvení β -karotenu
- odbarvení 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)
- odbarvení DPPH radikálu (2,2' - difenyl-1-pikrylhydrazyl).

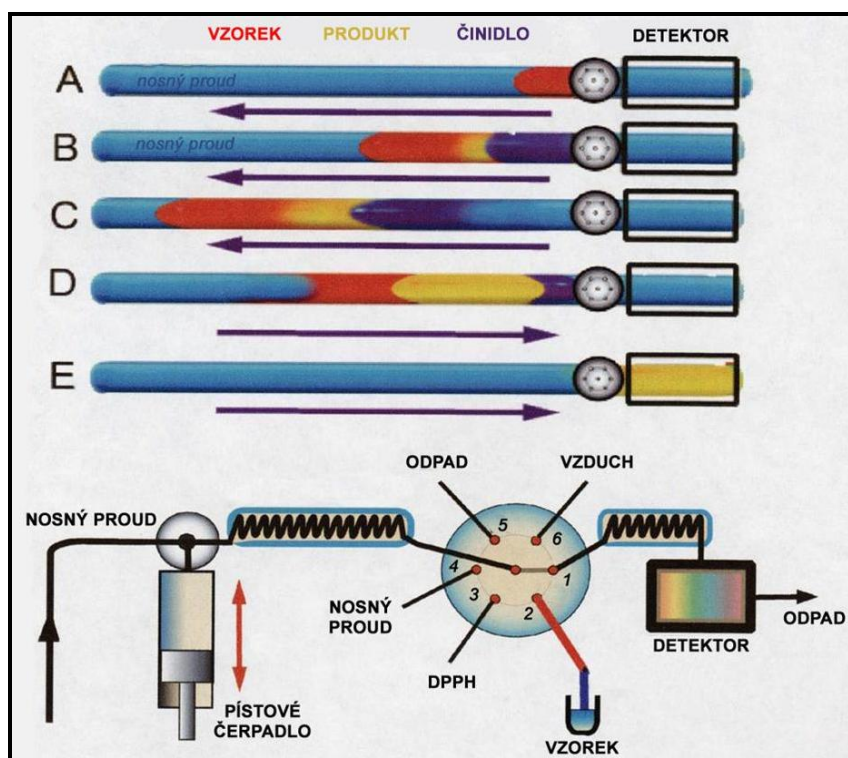
Tyto metody jsou vhodné pro rychlé posouzení inaktivačního efektu antioxidantů (Polášek, 2004).

3.2.2 Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis, SIA) je metoda umožňující rychlé monitorování a vyhodnocování antioxidační aktivity

v biologických vzorcích. Díky své rychlosti a citlivosti je SIA vhodná pro vykonávání rutinních testování na přítomnost antioxidantů ve velkých sériích lyofilizovaných rostlinných a houbových extraktů.

Analyt obsažený v roztoku vzorku je převeden na detekovatelný produkt. Produkt je získán smísením vzorku a činidla a jejich následnou chemickou reakcí v toku nosného proudu. S využitím šesticestného ventilu a pístového čerpadla je nejprve aspirována zóna nosného proudu, poté zóna vzorku, zóna činidla a nakonec opět zóna nosného proudu. Po aspiraci všech zón je pohyb čerpadla obrácen a dochází k promíslení vzorku s činidlem. Reakční produkt je unášen do průtokového detektoru s diodovým polem a je měřena absorbance tohoto produktu. Odezva detektoru má podobu píků. Součástí SIA systému je mikroprocesor (PC), s programovým vybavením, který řídí jednotlivé kroky cyklu, sbírá a vyhodnocuje výstupní data (Polášek, 2004).

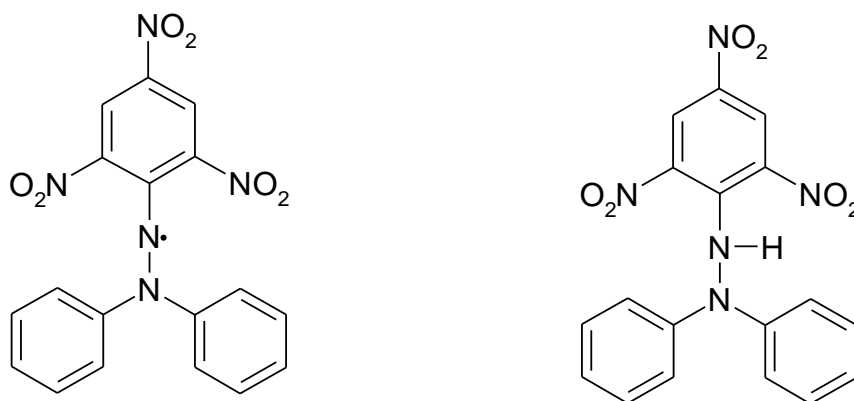


Obrázek 14: Princip SIA (Manuál k přístroji FIALab 3000 analyser)

3.2.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu

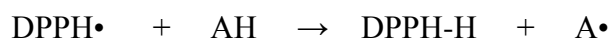
Metoda je založena na znalosti barevné reakce stabilního 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazylu (DPPH) s antioxidanty v organickém či vodně-organickém prostředí,

při níž dochází k odbarvení DPPH radikálu v důsledku interakce s analytem. Redukce DPPH je doprovázena poklesem absorbance při charakteristické vlnové délce. Absorpční maximum pro DPPH je při 525 nm. Snížení absorbance DPPH souvisí s koncentrací antioxidantu v testovaném vzorku. Za použití systému SIA trvá měření jednoho vzorku 4 minuty a je možné detekovat mikromolární koncentrace antioxidantu. Optimální hodnota pH pro měření je 5.



Obrázek 15. : DPPH• (volný radikál) a DPPH (neradikál)

DPPH je velmi stabilní radikál a může být inaktivován jen antioxidantem (AH), který je donorem vodíku (Polášek, 2004).



Obrázek 16 : Průběh reakce radikálů DPPH• s antioxidačně působící látkou

IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

A VÝSLEDKY

1. POTŘEBY

1.1. Rozpouštědla

Aceton č.

n-Butanol č.

Diethylether p. a.

Ethanol č. (EtOH)

Ethylformiát č. (HCOOEt)

Formaldehyd 36-38% p. a.

Isopropylalkohol 95% p. a.

Methanol č. (MeOH)

1-Propanol č. (PrOH)

Toluen p. a.

Voda superčistá (voda)

1.2. Chemikálie

Acetanhydrid č.

Anilin č.

Anisaldehyd p. a.

2,6-Dibromchinonchlorimid č.

Difenylamin č.

Dusičnan bismutitý zásaditý p. a.

Dusičnan měďnatý trihydrát p. a.

Dusitan sodný p. a.

Fast Blue B salt p. a.

D-Glukosa č.

Hexakynoželezitan draselný č.
Hydroxid amonný 26% č.
Hydroxid sodný č.
Hydroxylaminhydrochlorid p. a.
Chlorid železitý č.
Isatin č.
Jodid draselný č.
2,4,6-Kolidin p. a.
Křemelina č.
Kyselina chloristá 70% p. a.
Kyselina chlorovodíková 35% p. a. (HCl)
Kyselina octová 98% p. a. (CH₃COOH)
Kyselina fosforečná 85% p. a.
Kyselina mravenčí 85% p. a. (HCOOH)
Kyselina sírová 96% p. a.
Kyselina sulfanilová p. a.
Kyselina vinná č.
1,2-Naftochinon-4-sulfonová kyselina p. a.
Ninhydrin p. a.
Octan zinečnatý č.
Uhličitan sodný č.
Vanilin p. a.

1.3. Standardy

Fenylalanin
D-glukosa č.
Cholesterol
Kyselina L-askorbová č.
Kyselina gallová č.
Kyselina vinná č.
Resorcinol č.
β-Sitosterol č.
Skulerin č.

1.4. Přístrojové vybavení

- Počítačově řízený (pomocí programu Fiala for Windows 5.0) FIALab 3000 analyzátor (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA) opatřený pístovým čerpadlem o objemu 2,5 ml, šesticestným selekčním ventilem, USB2000-UV/VIS spektrofotometrem s halogenovou lampou LS-1 (Ocean Optics, USA) a průtokovou detekční celou SMA-Z s optickou délkou 1 cm; objem mísící cívky je 0,6 ml a spojovací teflonové hadičky (PTFE) mají průměr 0,72 mm.
- Ultrazvuková lázeň SONOREX Super 10P (Bandelin, Německo).
- Vakuová odparka Rotavapor R-114 a vodní lázeň Waterbath B-480 (Büchi, Švýcarsko).

1.5. Detekční činidla

D 1: UV $\lambda = 254$ nm

Chromatogram byl pozorován pod UV lampou při $\lambda = 254$ nm. Pozitivní reakce se projevila vznikem různě tmavých skvrn, ve kterých byl zhasen fluoreskující luminofor vrstvy chromatogramu.

D 2: UV $\lambda = 366$ nm

Chromatogram byl pozorován pod UV lampou při $\lambda = 366$ nm. Pozitivní reakce se projevila vznikem fluoreskujících skvrn.

D 3: Acetanhydrid – kyselina sírová (Liebermann-Burchardovo činidlo)

Před použitím bylo opatrně za chlazení smícháno 5 ml acetanhydridu s 5 ml koncentrované kyseliny sírové a získaná směs opatrně přidána do 50 ml ochlazeného absolutního ethanolu. Chromatogram byl po postřiku zahříván při teplotě 100 °C asi 7 minut a vyhodnocen pod UV světlem při $\lambda = 365$ nm. Při pozitivní reakci vznikají fluoreskující skvrny (Stahl, 1969).

D 4: Anisaldehyd – kyselina sírová

Do roztoku 0,5 ml anisaldehydu v 50 ml kyseliny octové byl přidán 1 ml kyseliny sírové. Chromatogram byl zahříván na 100 – 105 °C než různé barevné skvrny dosáhly maximální intenzity (Stahl, 1969).

D 5: 2,6-Dibromchinonchlorimid (Gibbsovo činidlo)

Po postřiku čerstvě připraveným 0,4% methanolovým roztokem 2,6-dibromchinonchlorimidu byl chromatogram umístěn do komory obsahující 26% hydroxid amonný. Fenolické sloučeniny tvořily s činidlem žluté až hnědé skvrny podle doby působení hydroxidu amonného (Stahl, 1969).

D 6: Difenylamin – anilin – kyselina fosforečná

1 g anilinu a 1 g difenylaminu byly rozpuštěny v 100 ml acetonu. 10 ml tohoto roztoku bylo před použitím smícháno s 1 ml 85% kyseliny fosforečné. Po postřiku byl chromatogram zahříván při 120 °C asi 5 minut. Vznikaly různě barevné skvrny (Šanšúnová, 1977).

D 7: Dragendorffovo činidlo podle Muniera

Roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody.

Roztok B: 16 g jodidu draselného bylo rozpuštěno ve 40 ml destilované vody.

Zásobní roztok byl připraven smícháním roztoku A a B v poměru 1:1 (v/v), který může být uchováván po několik měsíců v lednici.

Detekční roztok byl připraven rozpuštěním 10 g kyseliny vinné v 50 ml destilované vody a přidáním 5 ml zásobního roztoku. Alkaloidy byly po reakci s detekčním činidlem zbarveny oranžově (Stahl, 1969).

D 8: Fast Blue B salt

Detekční roztok I: čerstvě připravený 0,5% roztok Fast Blue B salt

Detekční roztok II: 0,1M NaOH

Chromatogram byl nejprve postřikán roztokem I, po uschnutí chromatogramu roztokem II.

Vznikaly různě zbarvené skvrny (Stahl, 1969).

D 9: Glukosa – anilin (Schweppovo činidlo)

Roztok A: 10% vodný roztok glukosy

Roztok B: 10% etanolový roztok anilinu

Činidlo připraveno smícháním roztoku A a B (po 20 ml) a zředěno na 100 ml n-butanolem. Chromatogram byl zahříván 10 minut na 115 °C. Vznikaly červené až hnědé skvrny (Stahl, 1969).

D 10: Hexakynoželezitan draselný – chlorid železitý

2% roztok chloridu železitého byl smíchán s 1% roztokem hexakynoželezitanu draselného (1:1). Vznikají modré skvrny. Činidlo je stále nejdéle 5 minut. Vznikaly modré, resp. zelené skvrny (Stahl, 1969).

D 11: Hydroxylamin – chlorid železitý

Roztok A: byl připraven rozpuštěním 20 g chloridu hydroxylaminia v 50 ml vody a doplněním do 200 ml ethanolem.

Roztok B: byl připraven rozpuštěním 50 g hydroxidu draselného v minimálním množství vody a zředěn na 500 ml ethanolem.

Detekční roztok I: byl získán smícháním roztoku A s roztokem B s poměru 1:2 a odfiltrováním vyloučeného chloridu draselného.

Detekční roztok II: byl získán rozpuštěním 10 g chloridu železitého ve 20 ml 35% kyseliny chlorovodíkové a protřepáním s 200 ml diethyletheru do vzniku homogenního roztoku. K detekci byl použit nejprve detekční roztok I, po uschnutí chromatogramu pak roztok II. Vznikaly různě zbarvené skvrny (hnědofialové-fialové) (Stahl, 1969).

D 12: Isatin – octan zinečnatý

Isatin (1 g) a octan zinečnatý (1,5 g) byly rozpuštěny ve 100 ml 95% isopropylalkoholu za tepla do 80 °C. 1 ml octové kyseliny bylo přidáno po ochlazení. Chromatogram byl ponechán asi 20 hodin při pokojové teplotě a byl pozorován. Při pozitivní reakci byly pozorovány až červené skvrny (Stahl, 1969).

D 13: 1,2-Naftochinon-4-sulfonová kyselina – kyselina chloristá

0,1 g 1,2-naftochinon-4-sulfonové kyseliny bylo rozpuštěno ve 100 ml směsi (20 ml ethanolu + 10 ml 60% kyseliny chloristé + 1 ml formaldehydu + 9 ml destilované vody). Po postřiku činidlem byl chromatogram zahřátý na 70–80 °C a byly pozorovány různě barevné skvrny (Stahl, 1969).

D 14: Ninhydrin – kolidin

Roztok A: byl připraven smícháním 0,2% roztoku ninhydrinu v 50 ml absolutního ethanolu, 10 ml ledové kyseliny octové a 2 ml 2,4,6-kolidinu.

Roztok B: 1% roztok trihydrátu dusičnanu měďnatého v absolutním ethanolu.

Před použitím byl smíchán roztok A s roztokem B v poměru 5:3. Po postřiku byl chromatogram zahříván při 100 °C 1-2 minuty. Při pozitivní reakci byly pozorovány různě zbarvené skvrny (Šanšúnová, 1977).

D 15: Paulyho činidlo (diazotovaná kyselina sulfanilová)

4,5 g kyseliny sulfanilové bylo za tepla rozpuštěno ve 45 ml kyseliny chlorovodíkové (12M) a zředěno vodou na 500 ml. 10 ml bylo ochlazen v chladničce a pak k němu bylo přidáno 10 ml ochlazeného 4,5% roztoku dusitanu sodného. Získaný roztok byl ponechán 15 minut v chladničce. Bezprostředně před použitím byl smíchán s 20 ml 10% roztoku uhličitanu sodného. Pozitivně reagující látky tvořily s činidlem oranžové skvrny (Stahl, 1969).

D 16: Vanilin – kyselina sírová

Vanilin (3 g) byl rozpuštěn v ethanolu (100 ml) a do roztoku přidána koncentrovaná kyselina sírová (3 ml). Chromatogram byl zahříván na 110 °C. Vznikly různě barevné skvrny (Stahl, 1969).

1.6. Vytváření soustav pro tenkovrstvou chromatografii

S 1: toluen + ethylformiát + kyselina mravenčí = 50 + 40 + 10

(toluen + HCOOEt + HCOOH)

S 2: n-propanol + voda = 90 + 10

(PrOH + voda)

1.7. Chromatografický adsorbent

TLC Silica gell 60 F₂₅₄ (Merck, Německo)

2. PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ

2.1. Materiál

Plodnice hub byly nasbírány v květnu až říjnu roku 2006, 2007, 2008 a systematicky klasifikovány Východočeskou mykologickou společností. Následně byly zmrazeny tekutým dusíkem a do zpracování uchovávány v plastických sáčcích při teplotě $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabulka 2: Informace o jednotlivých taxonech

Číslo taxonu	Název taxonu	Čeleď	Místo nalezení	Datum nálezu
1	<i>Amanita crocea</i> (Quél.) Kühner & Romang.	<i>Amanitaceae</i>	výstava	6.10.2006
2	<i>Bolbitius vitellinus</i> (Pers.) Fr.	<i>Bolbitiaceae</i>	HK, Slezské předměstí, háječek	21.5.2006
3	<i>Cortinarius traganus</i> (Fr. ex Fr.) Fr.	<i>Cortinariaceae</i>	výstava	10.10.2008
4	<i>Cystoderma terrei</i> (Berk. & Broome) Hatmaja	<i>Agaricaceae</i>	Borohrádek	6.10.2006
5	<i>Hebeloma circinans</i> (Quél.) Sacc.	<i>Bolbitiaceae</i>	výstava	6.10.2006
6	<i>Hygrophorus pratensis</i> (Pers.) Fr.	<i>Hygrophoraceae</i>	výstava	14.10.2007
7	<i>Lycoperdon pyriforme</i> Schaeff.	<i>Lycoperdaceae</i>	výstava	10.10.2008
8	<i>Oudemansiella mucida</i> (Schrad. ex Fr.) Hohn.	<i>Tricholomataceae</i>	Petrovice	10.10.2008
9	<i>Psathyrella multipedata</i> (Peck) A. H. Sm.	<i>Coprinaceae</i>	výstava	6.10.2006
10	<i>Rhodocybe gemina</i> (Fr.) Kuyper & Noordel.	<i>Entolomataceae</i>	výstava	14.10.2007
11	<i>Rhodocybe gemina</i> (Fr.) Kuyper & Noordel.	<i>Entolomataceae</i>	NHK, u Biřičky	10.10.2008
12	<i>Tricholoma album</i> (Schaeff.) P. Kumm	<i>Tricholomataceae</i>	HK, Šimkovy sady	14.10.2007
13	<i>Tricholoma sejunctum</i> (Sowerby) Quél.	<i>Tricholomataceae</i>	Vřešťovská bažantice, Velký Vřešťov	5.9.2006
14	<i>Tricholomopsis decora</i> (Fr.) Sing.	<i>Tricholomataceae</i>	výstava	6.10.2006

2.2. Extrakce drogy a příprava lyofilizátu z drog

Navážený očištěný vzorek plodnice hub (max. 15 g) byl po rozmixování extrahován 70% EtOH (poměr houby (g) : 70% EtOH (ml) = 1 : 15). Extrakce probíhala sonikací v ultrazvukové lázni při laboratorní teplotě, stupni intenzity 10, po dobu 30 minut. Filtrací byl oddělen pevný podíl od extraktu a pevný podíl byl promyt 3x 10 ml 70% EtOH. Filtrát byl zahuštěn na vakuové rotační odparce při teplotě 50 °C až do odstranění ethanolu. Do baňky bylo přilito cca 10 ml superčisté vody a roztok byl zfiltrován přes křemelinu na filtračním tubusu za sníženého tlaku do 100 ml baňky. Filtrační vrstva byla promyta 3x 5 ml superčisté vody. Extrakt byl částečně odpařen, dobře uzavřen a uschován v lednici. Poté následovala lyofilizace. Lyofilizát byl umístěn přes noc do exikátoru, kde došlo k odstranění zbytkové vody. Lyofilizovaný extrakt byl přeplněn do penicilinek, převrstven argonem a uzavřen. Takto připravené extrakty se uchovávají v mrazničce a jsou výchozím materiálem pro stanovení antioxidační aktivity a pro hodnocení tenkovrstvou chromatografií.

3. HODNOCENÍ EXTRAKTŮ BAREVNÝMI REAKCEMI NA TLC

Vzorky pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly připraveny rozpuštěním 5 mg lyofilizátu v 1 ml 70% EtOH. Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna vzestupným způsobem v chromatografických komorách sycených 60 minut parami elučních soustav.

Adsorbent: TLC Silica gell 60 F₂₅₄ (Merck, Německo)

Dráha: 80 mm

Soustava: S 1: toluen + HCOOEt + HCOOH = 50 + 40 + 10

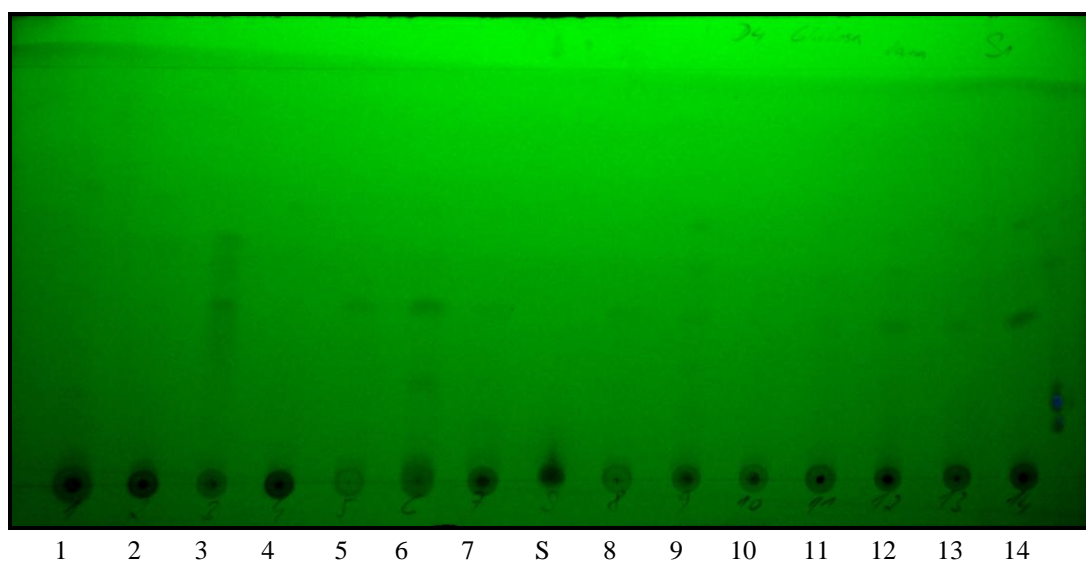
S 2: PrOH + voda = 90 + 10

Detekce: D 1 – D 16

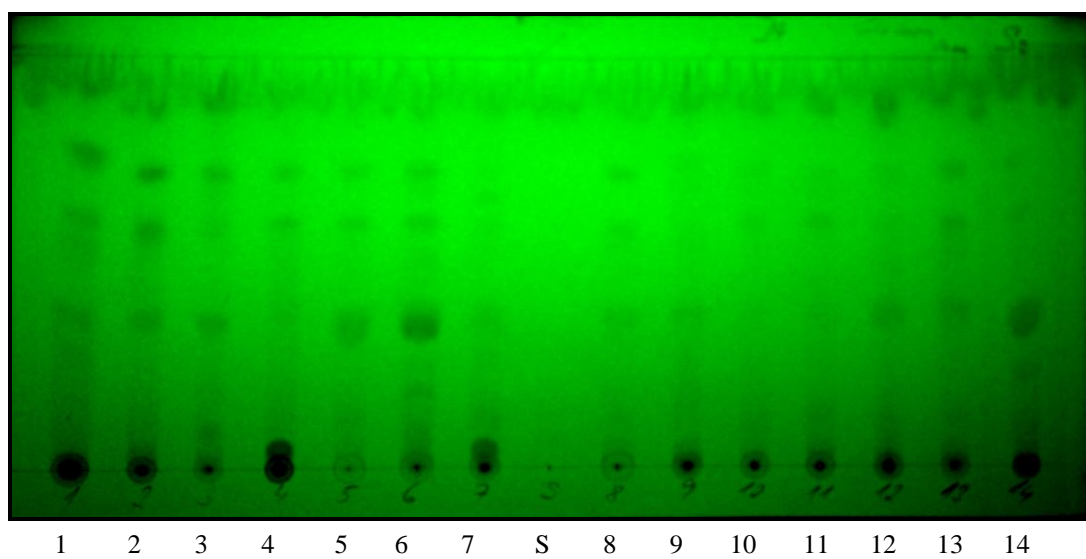
Dráhy jednotlivých vzorků hub 1- 14 (viz. tabulka 2).

Dráha S – dráha uvedeného standardu.

Detekce pod UV $\lambda=254$

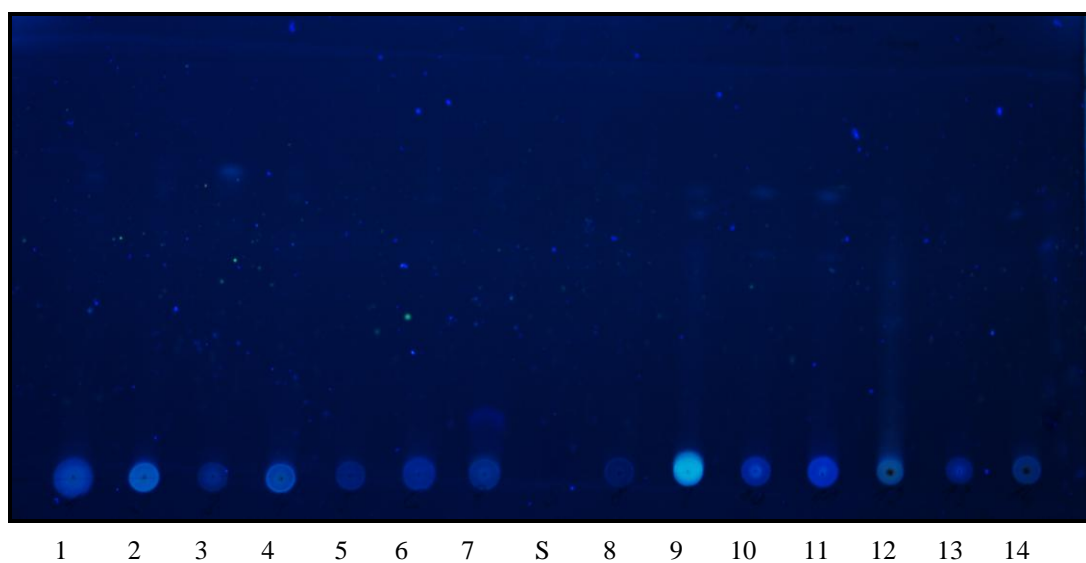


Obrázek 17: S 1, D 1

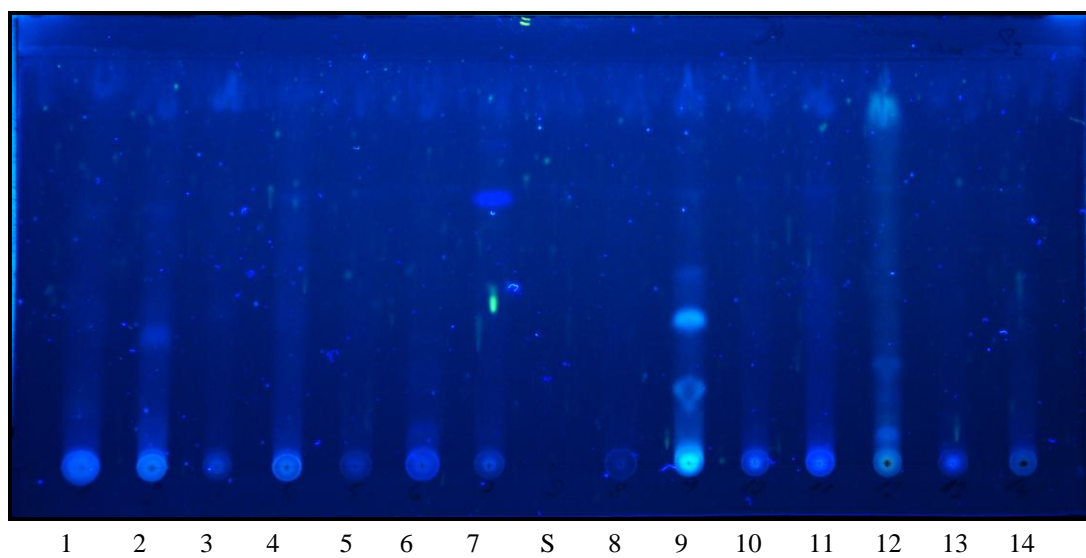


Obrázek 18: S 2, D 1

Detekce pod UV $\lambda=366$

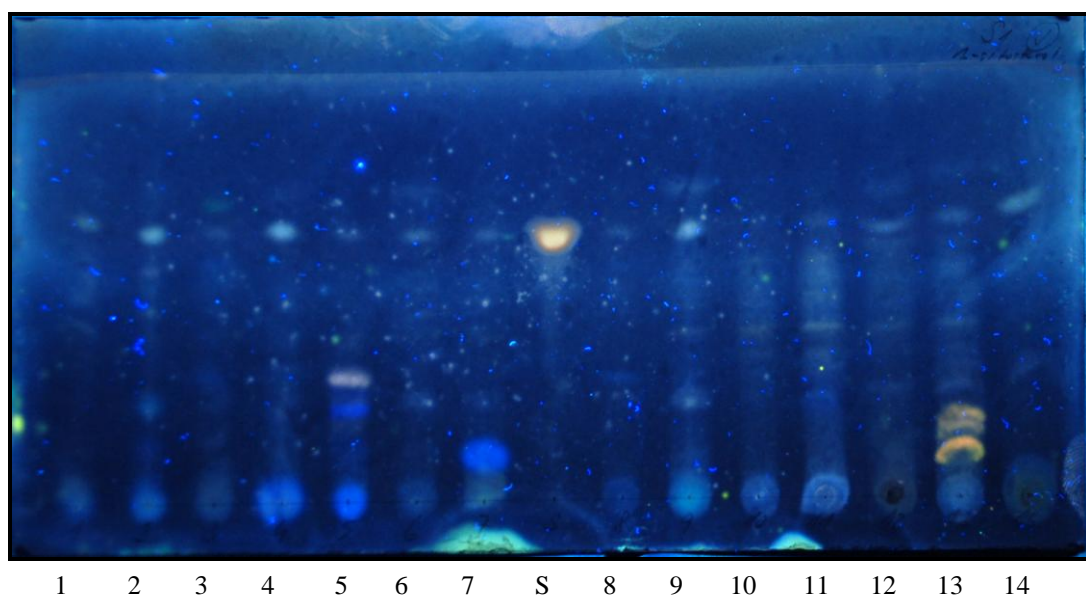


Obrázek 19: S 1, D 2

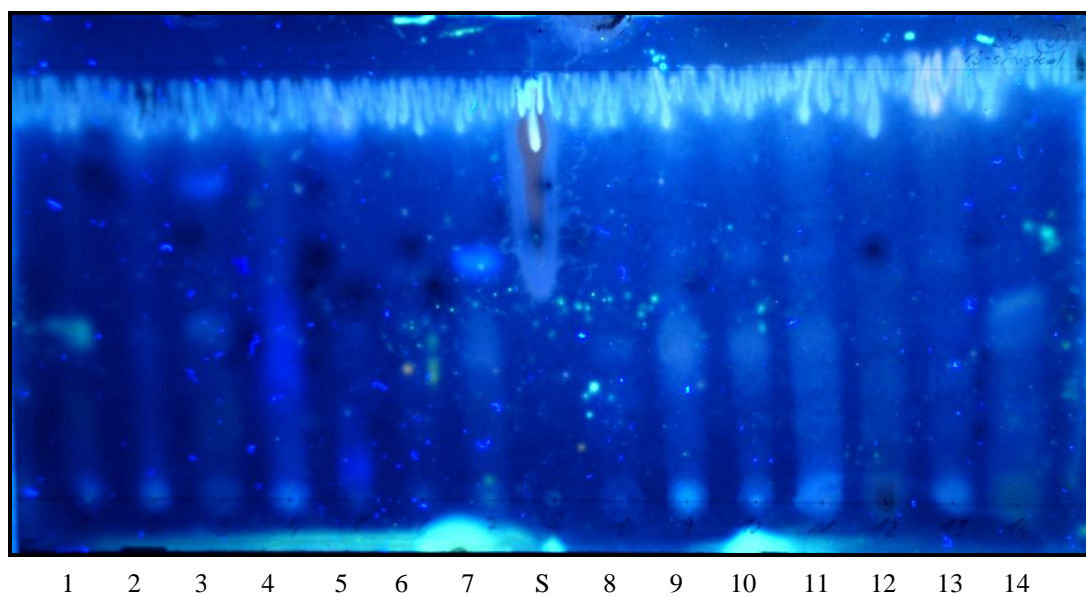


Obrázek 20: S 2, D 2

Detekce na steroly, steroidy a triterpeny



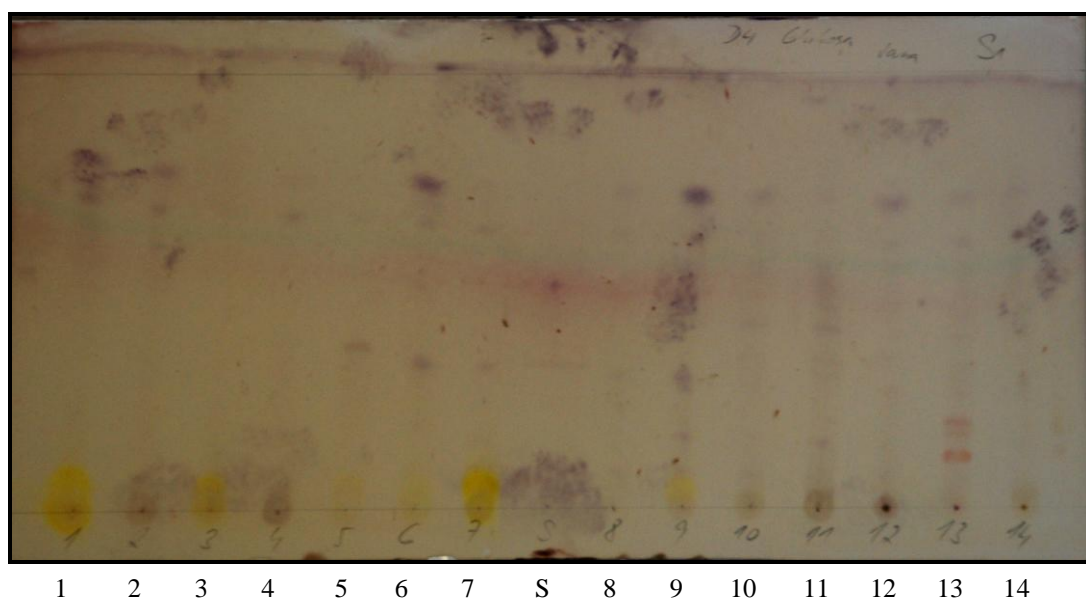
Obrázek 21: S 1, D 3



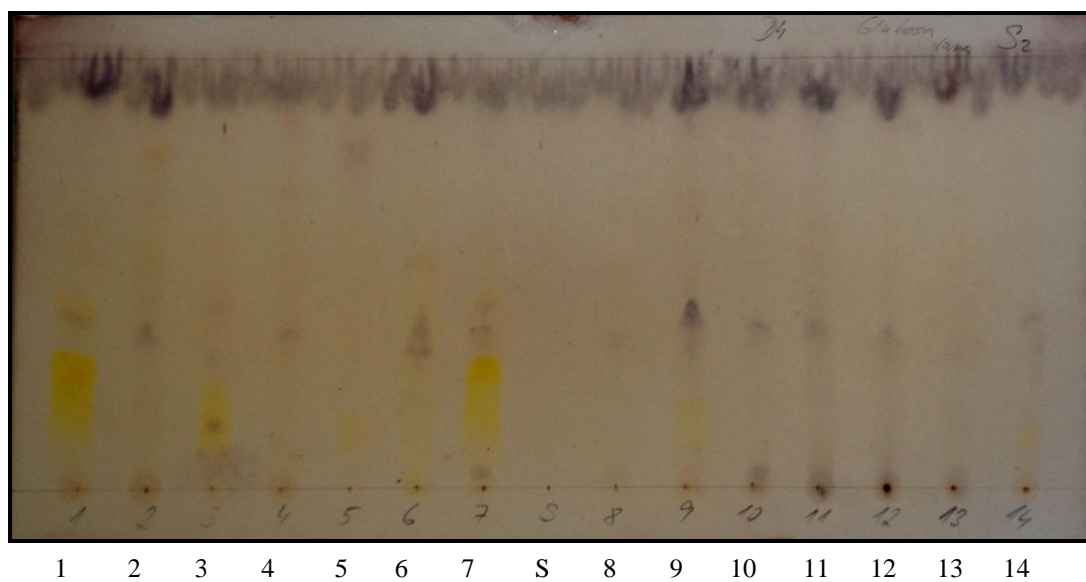
Obrázek 22: S 2, D 3

Standard: β -Sitosterol

Detekce na cukry, steroidy, terpeny



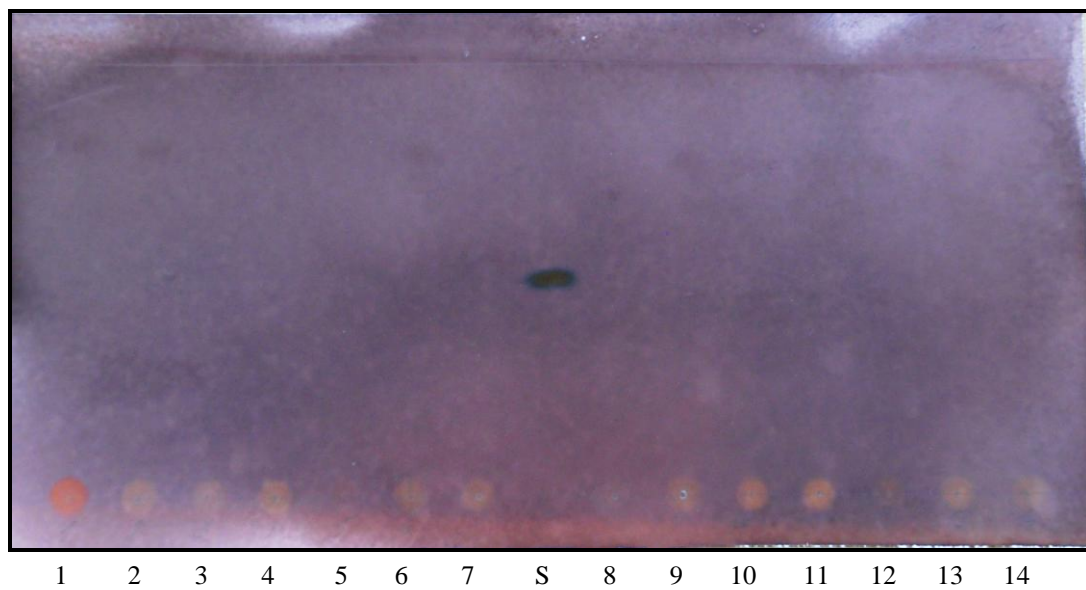
Obrázek 23: S 1, D 4



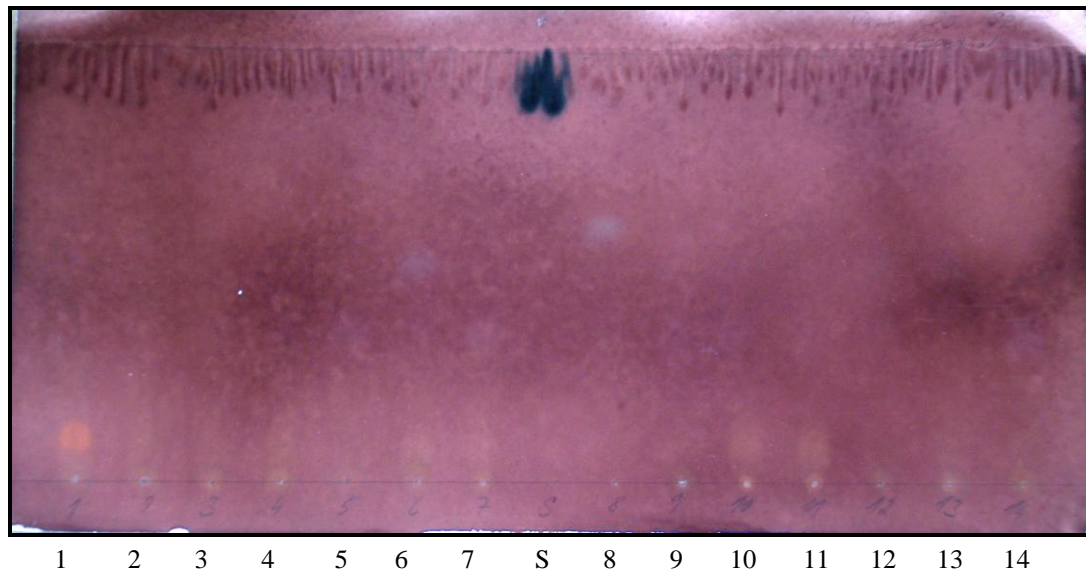
Obrázek 24: S 2, D 4

Standard: D-glukosa

Detekce na fenolické sloučeniny



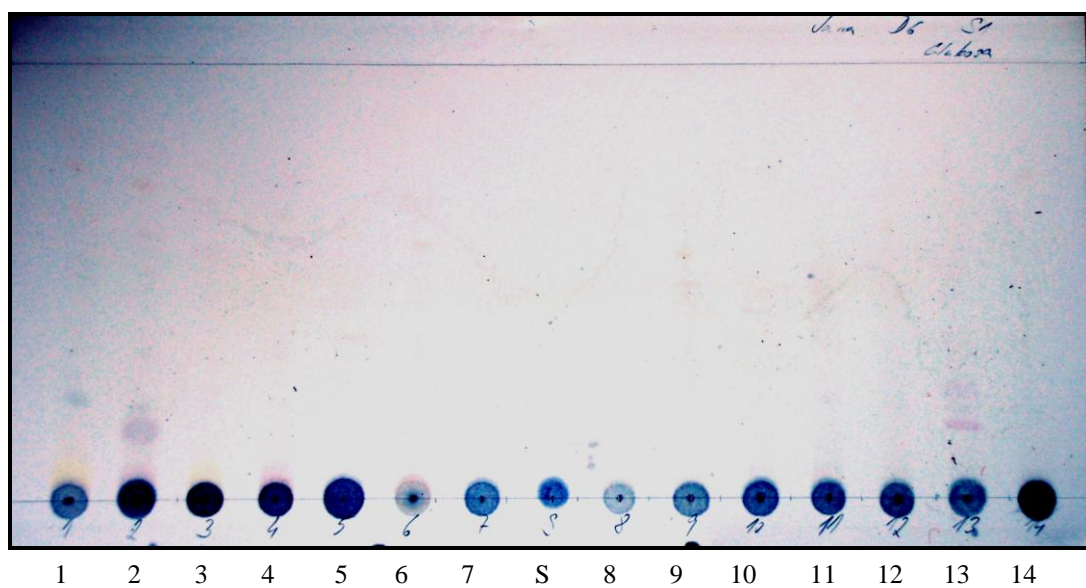
Obrázek 25: S 1, D 5



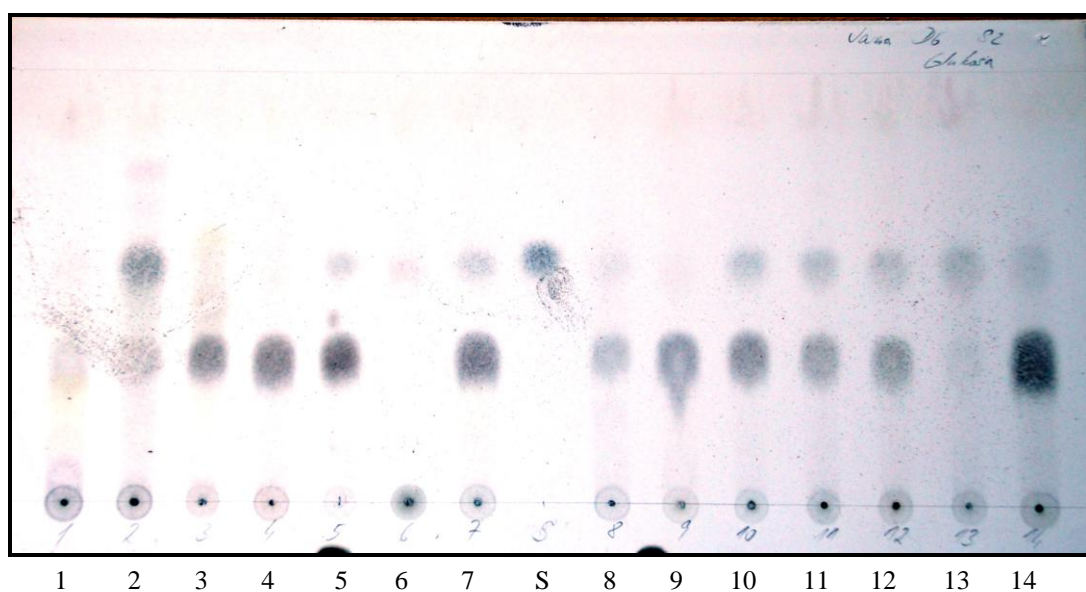
Obrázek 26: S 2, D 5

Standard: Resorcinol

Detekce na cukry



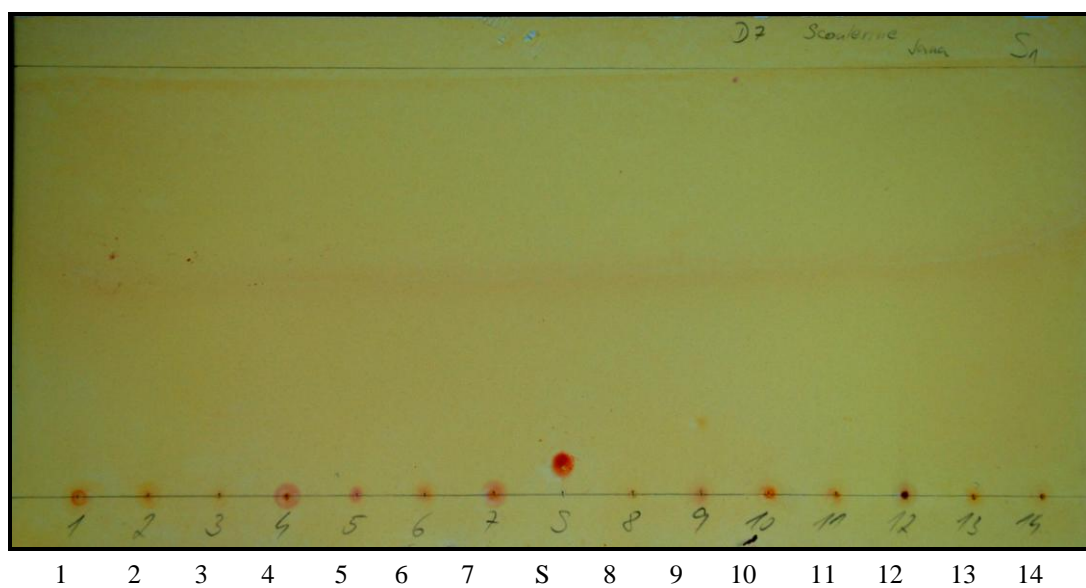
Obrázek 27: S 1, D 6



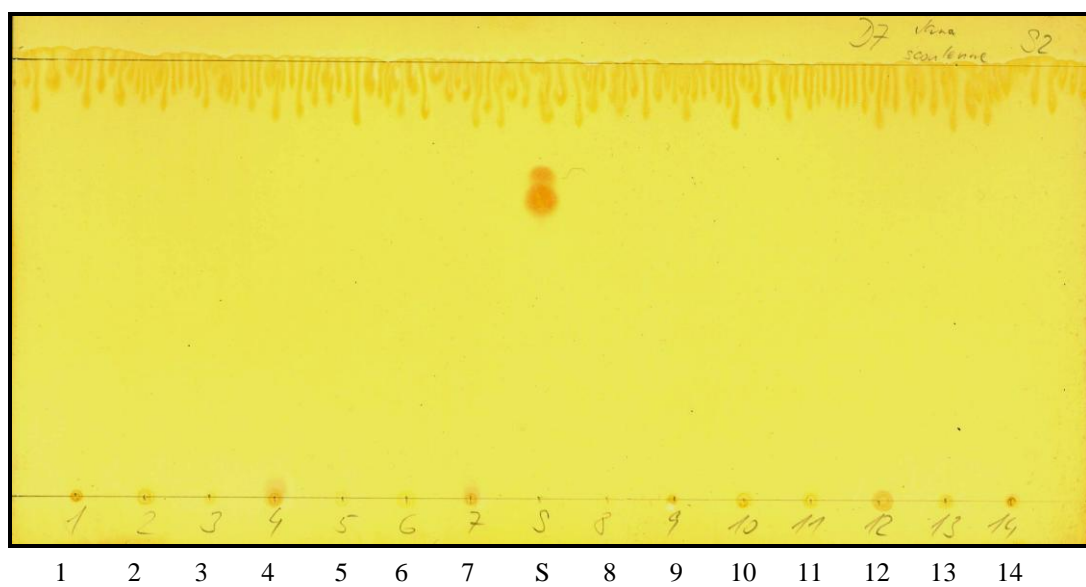
Obrázek 28: S 2, D 6

Standard: D-glukosa

Detekce na alkaloidy



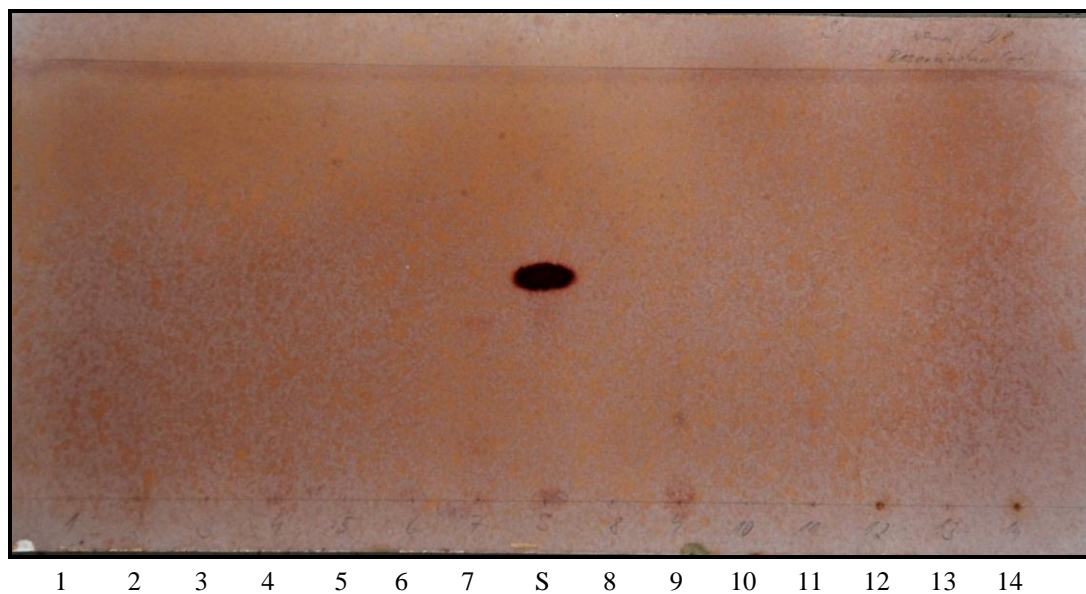
Obrázek 29: S 1, D 7



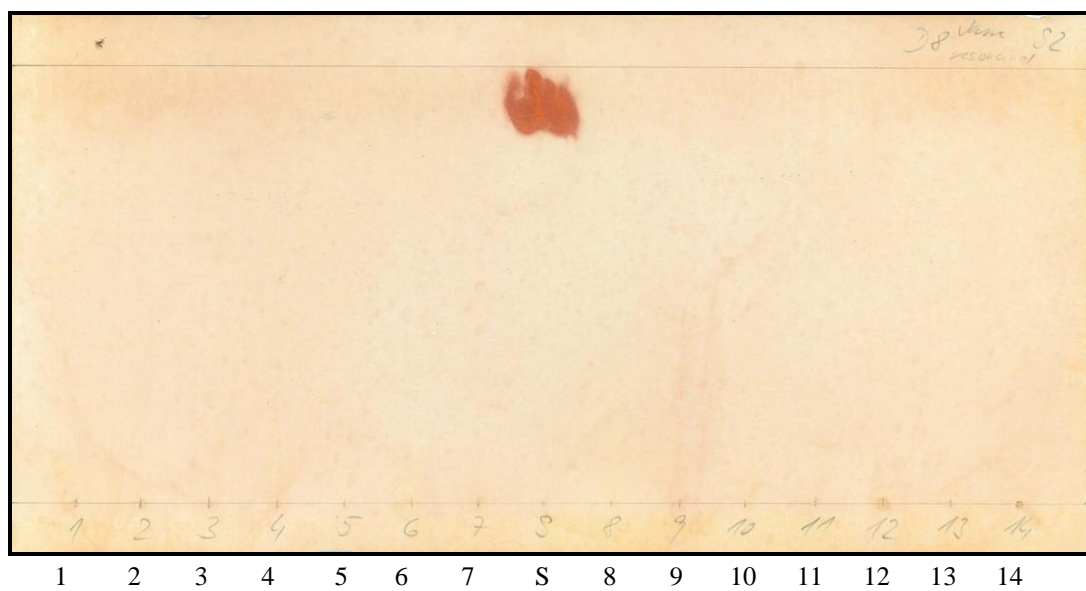
Obrázek 30: S 2, D 7

Standard: Skulerin

Detekce na fenolické sloučeniny



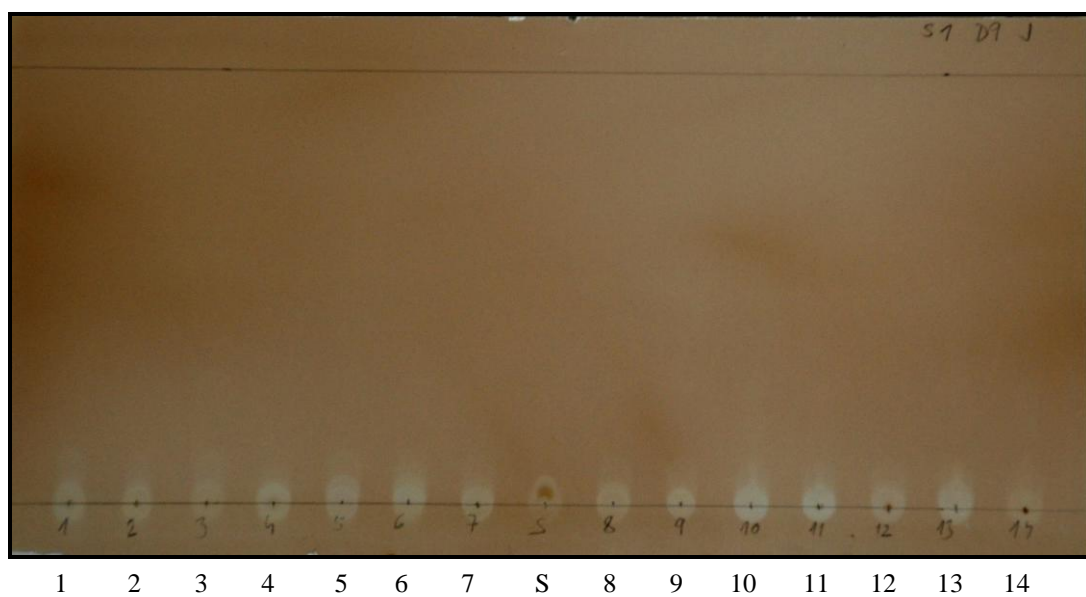
Obrázek 31: S 1, D 8



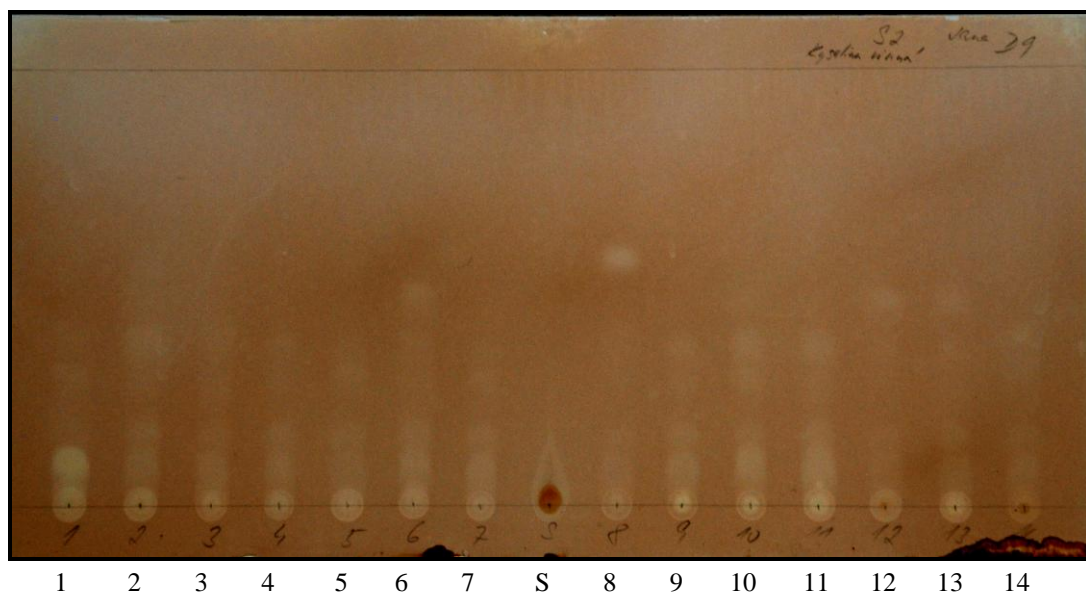
Obrázek 32: S 2, D 8

Standard: Resorcinol

Detekce na karboxylové kyseliny



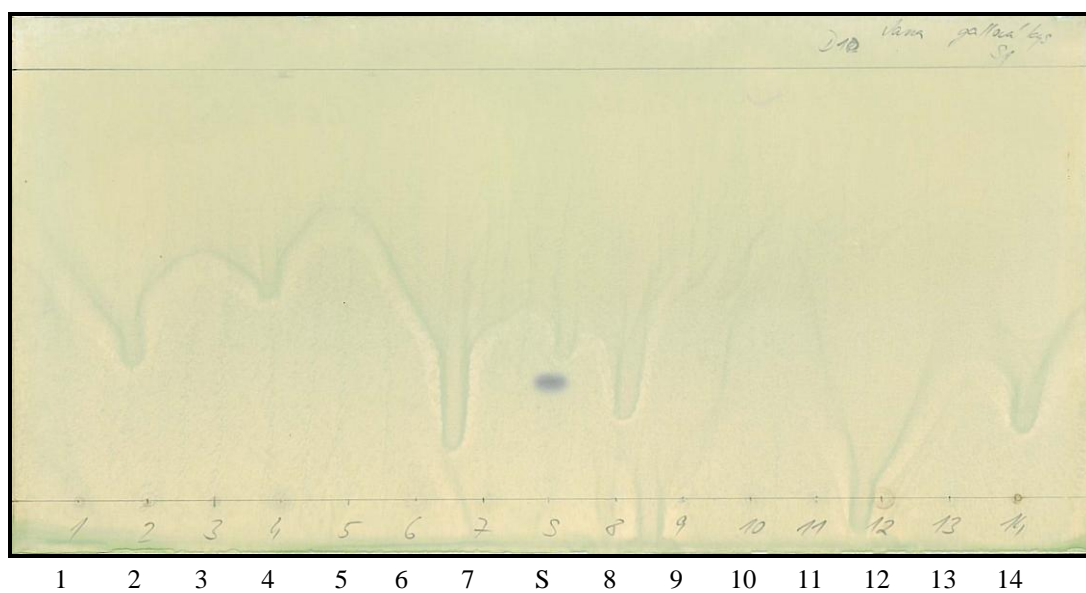
Obrázek 33: S 1, D 9



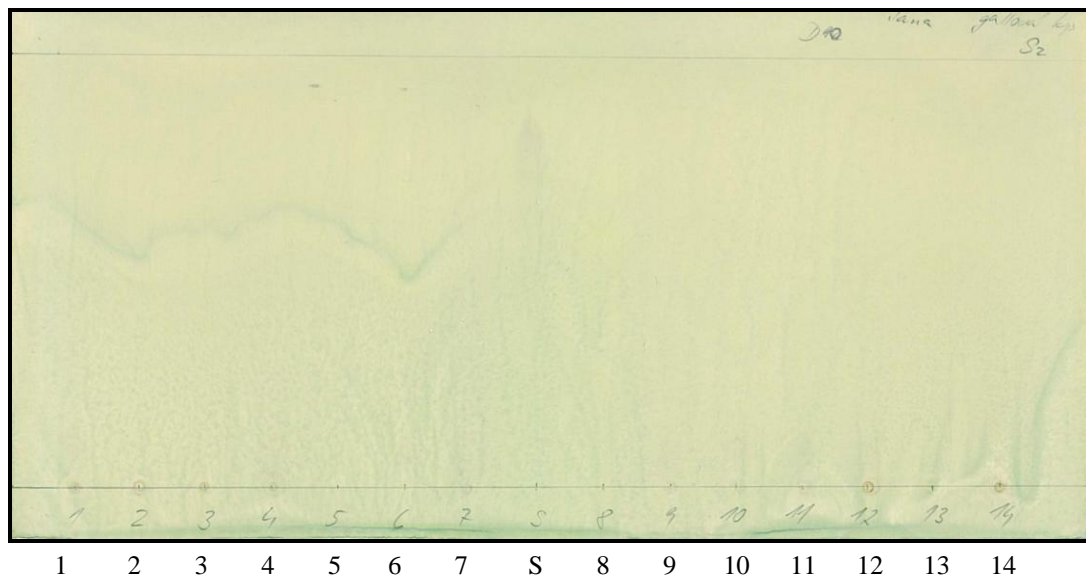
Obrázek 34: S 2, D 9

Standard: Kyselina vinná

Detekce na redukující látky (fenoly, aminy...)



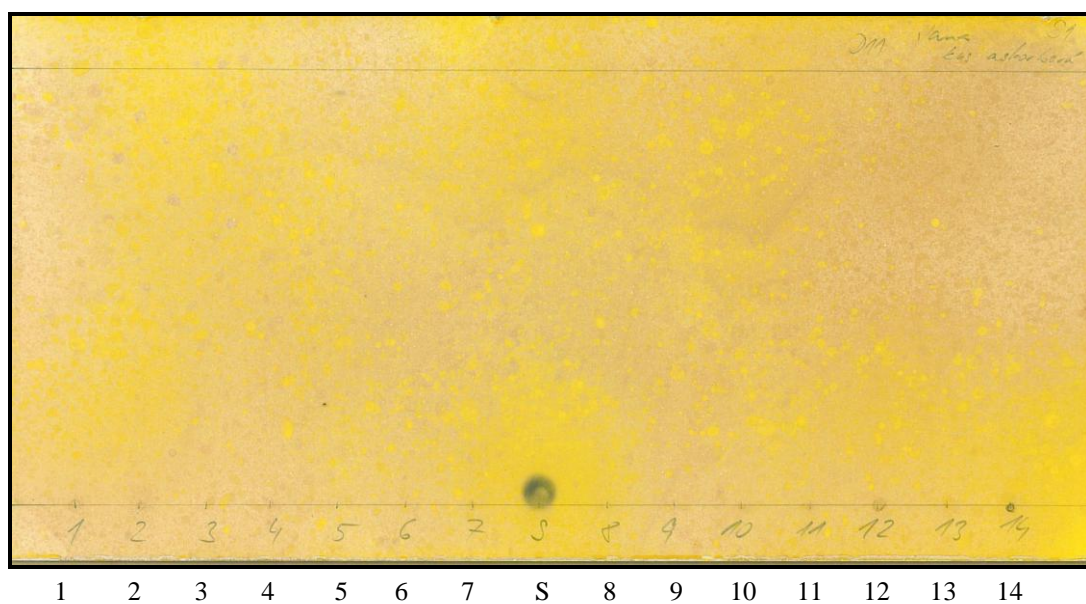
Obrázek 35: S 1, D 10



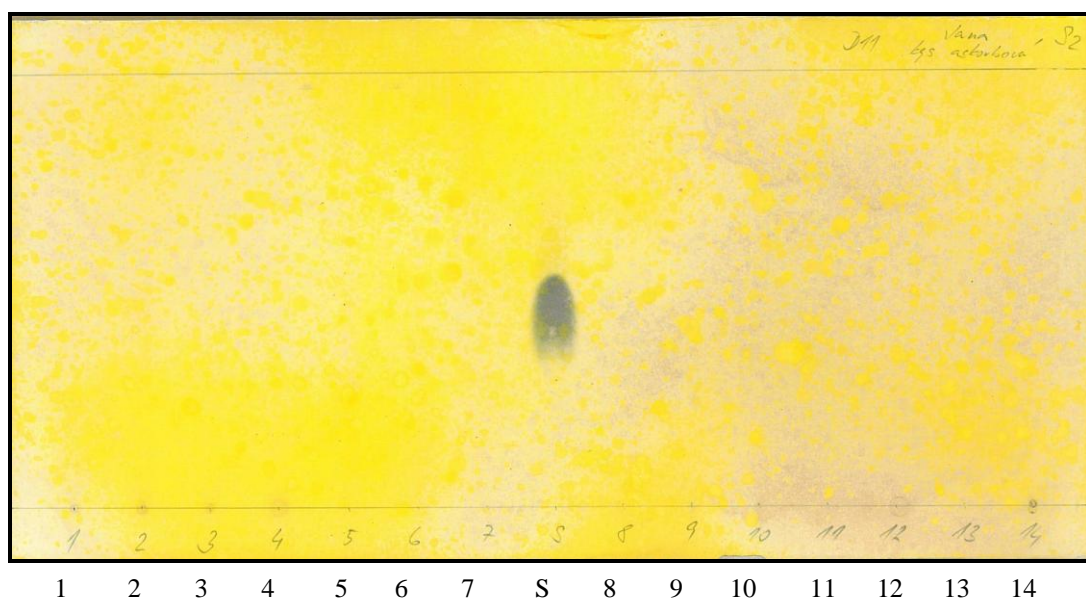
Obrázek 36: S 2, D 10

Standard: Kyseliny gallová

Detekce na laktony



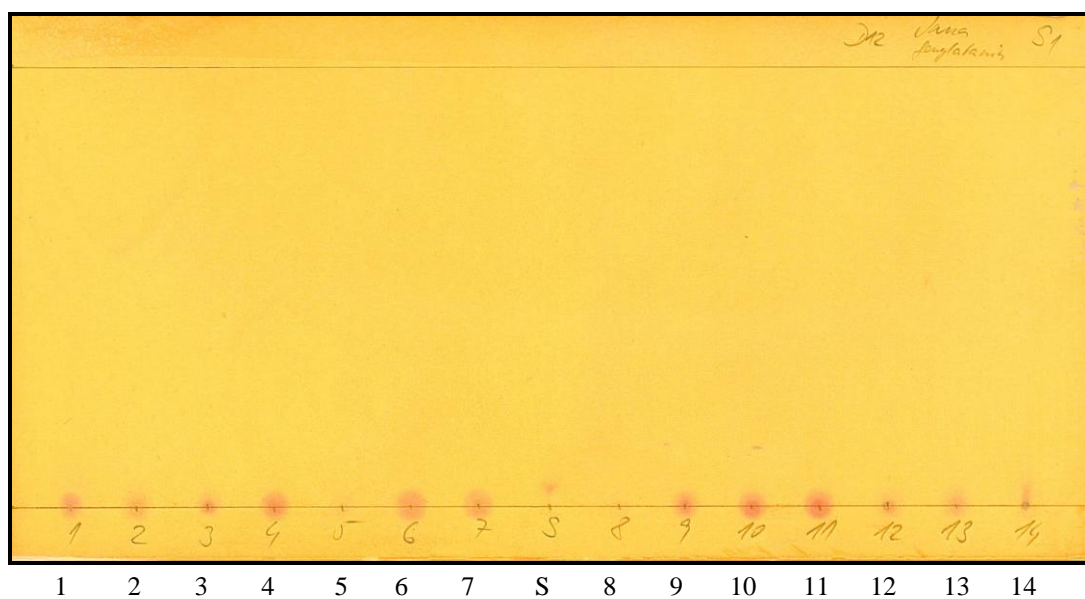
Obrázek 37: S 1, D 11



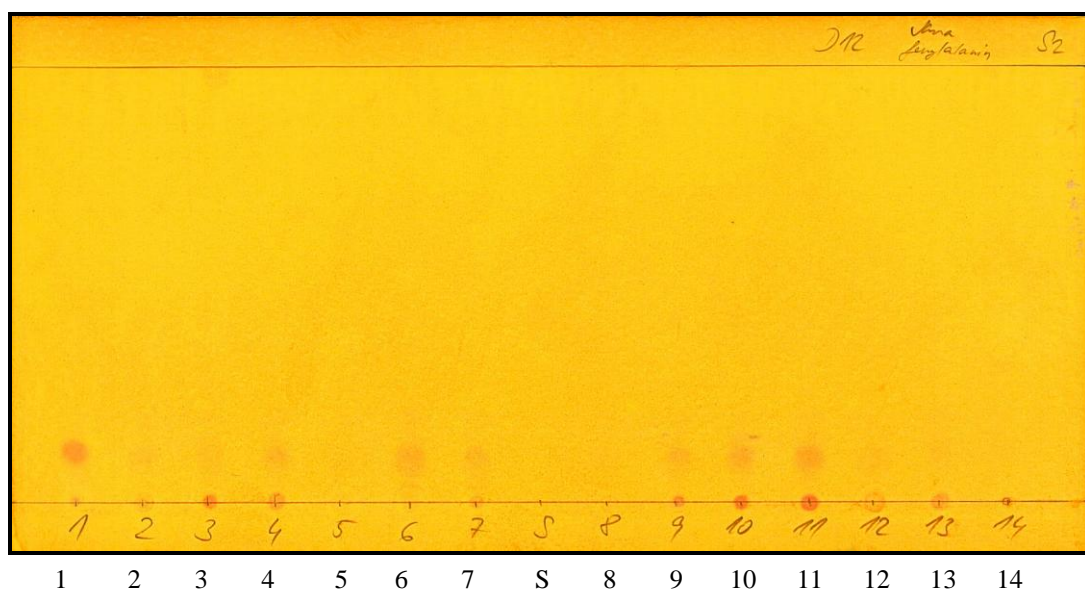
Obrázek 38: S 2, D 11

Standard: Kyselina L-askorbová

Detekce na aminokyseliny



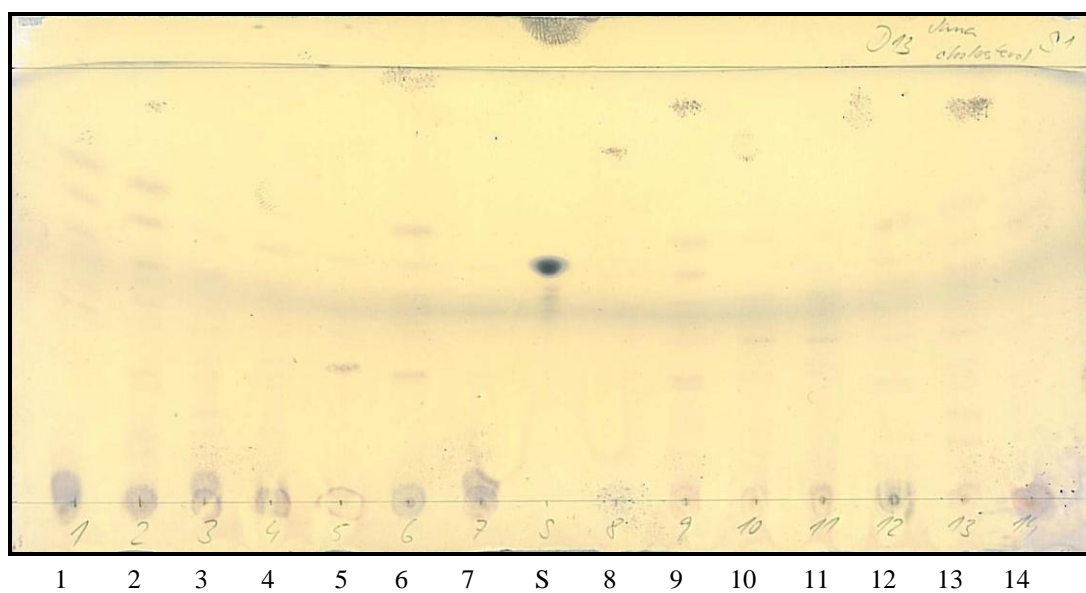
Obrázek 39: S 1, D 12



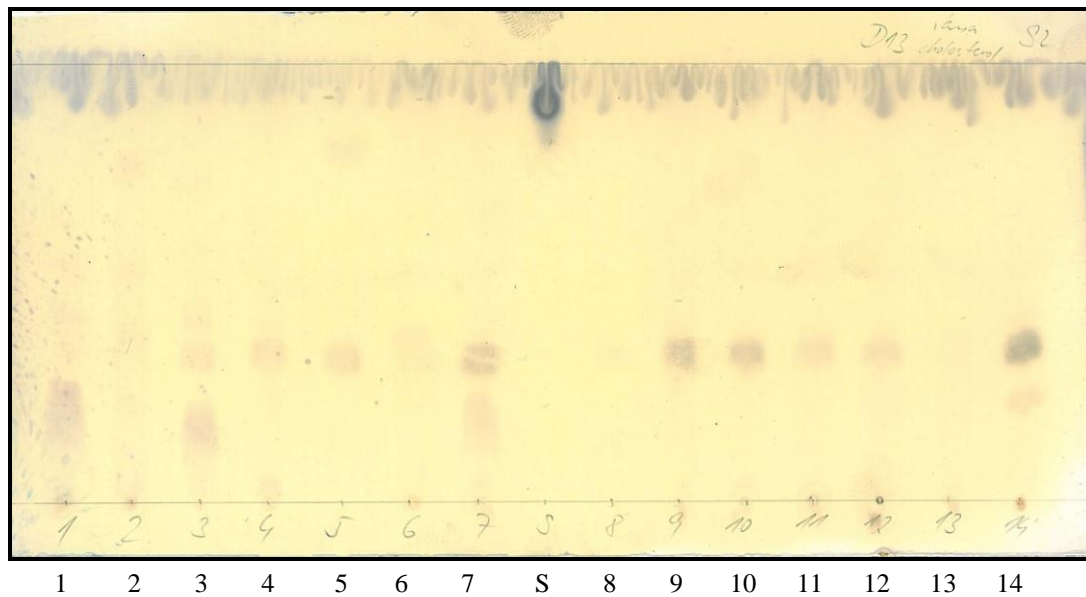
Obrázek 40: S 2, D 12

Standard: Fenylalanin

Detekce na steroly



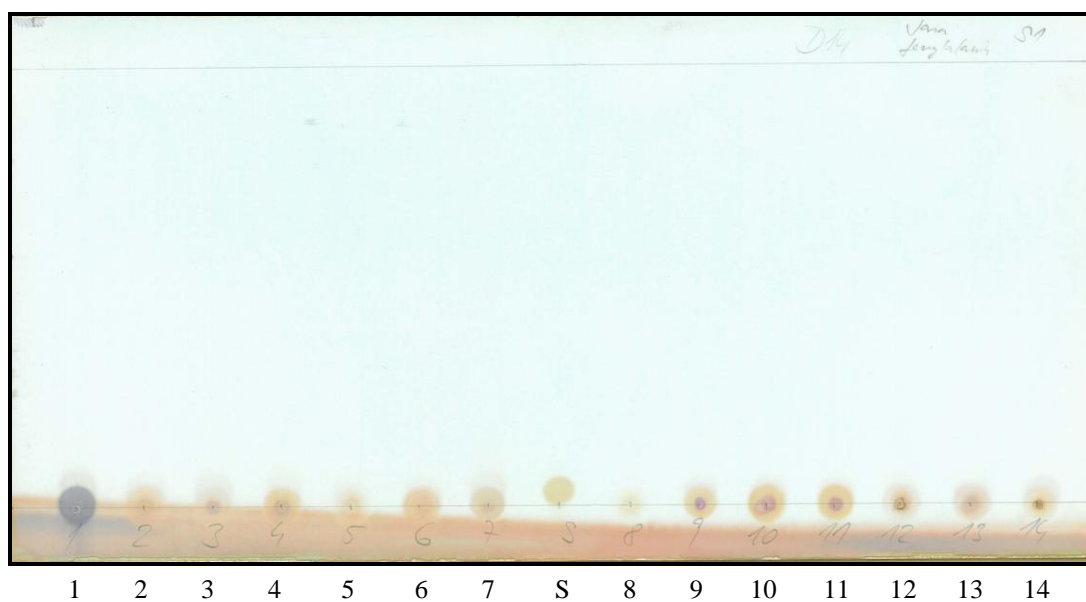
Obrázek 41: S 1, D 13



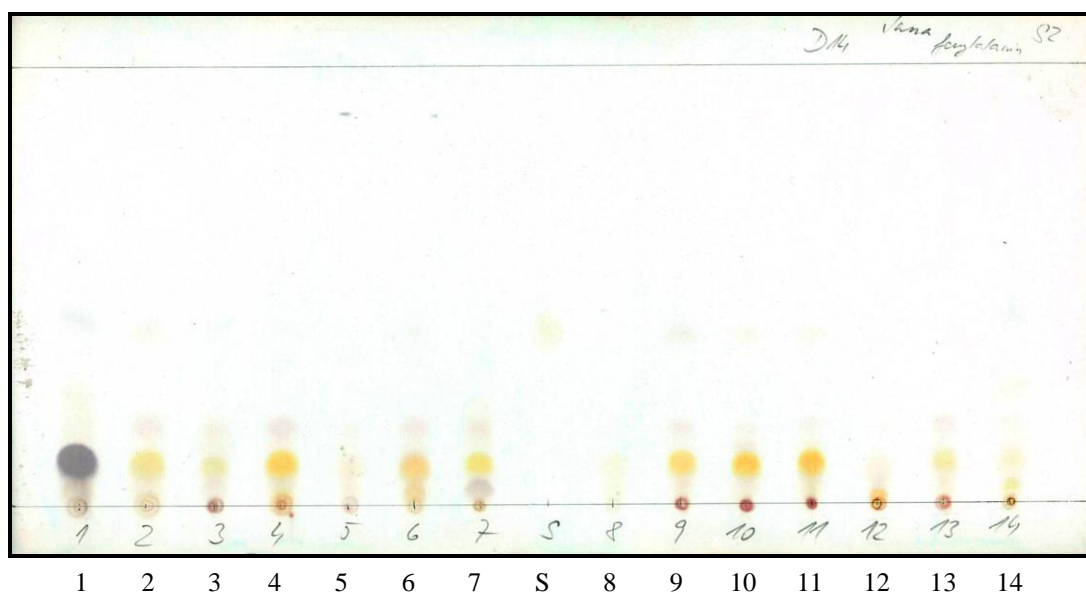
Obrázek 42: S 2, D 13

Standard: Cholesterol

Detekce na aminokyseliny



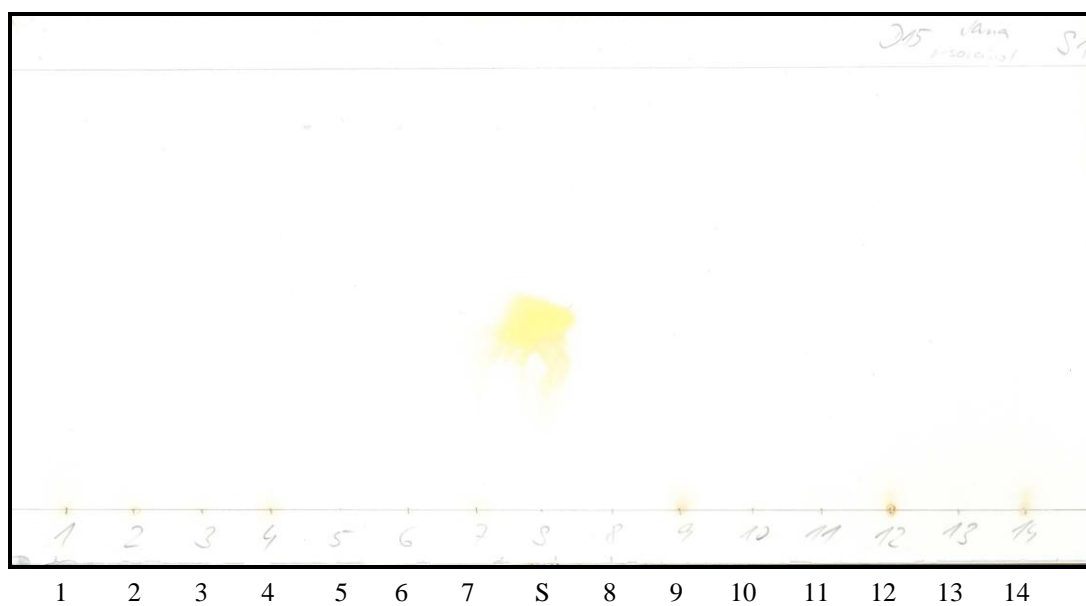
Obrázek 43: S 1, D 14



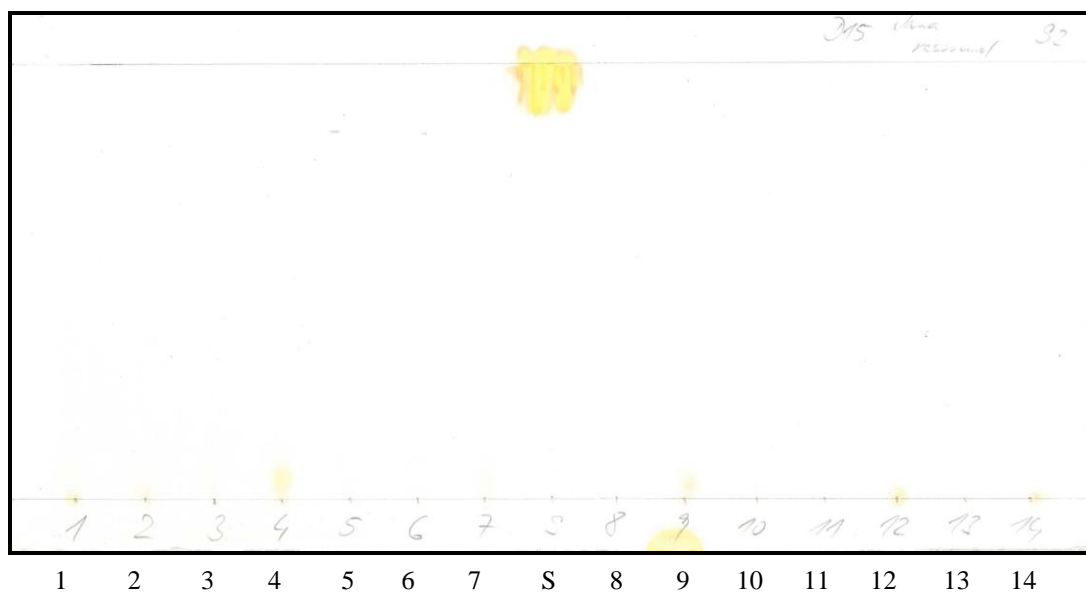
Obrázek 44: S 2, D 14

Standard: Fenylalanin

Detekce na fenoly a aminy



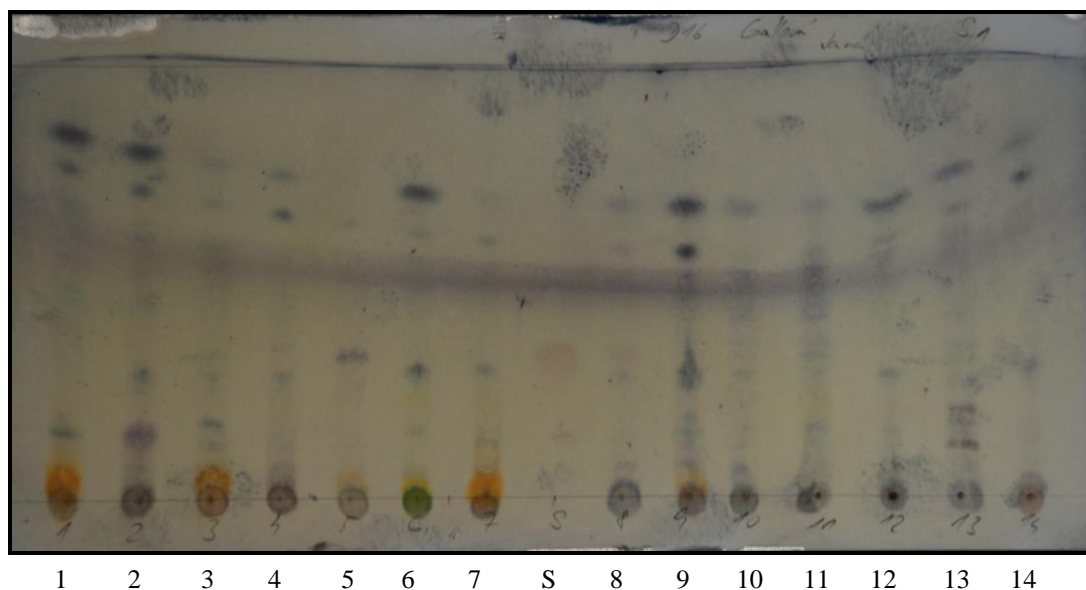
Obrázek 45: S 1, D 15



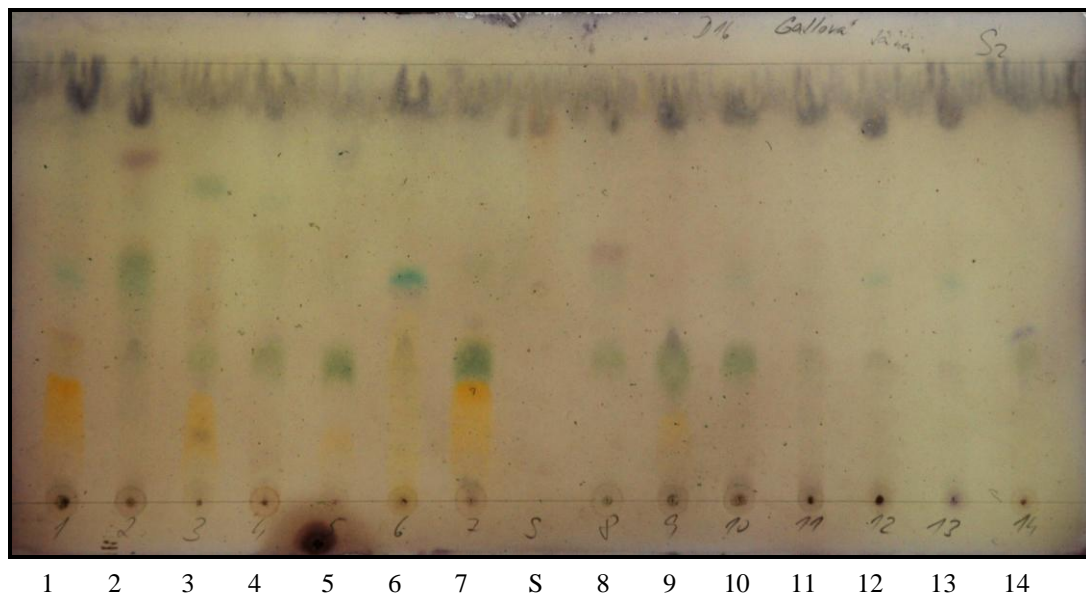
Obrázek 46: S 2, D 15

Standard: Resorcinol

Detekce na fenoly, steroidy, vyšší alkoholy



Obrázek 47: S 1, D 16



Obrázek 48: S 2, D 16

Standard: Kyselina gallová

3.1. Vyhodnocení reakcí na detekce D 1 – D 16

Vysvětlivky k tabulce 3

ST + pozitivní reakce na detekci na startu

ST 0 pozitivní reakce na startu nebyla po detekci pozorována

X+ počet pozitivních reakcí na detekci na dráze (X=1,2,3...)

0 žádná pozitivní reakce na detekci na dráze

Tabulka 3 : Pozitivní reakce na detekce u sledovaných taxonů

Číslo vzorku	Taxon	D 1, S 1	D 1, S 2	D 2, S 1
1	<i>Amanita crocea</i>	ST +, 0	ST +, 4+	ST +, 2+
2	<i>Bolbitius vitellinus</i>	ST +, 0	ST +, 4+	ST +, 2+
3	<i>Cortinarius traganus</i>	ST +, 3+	ST +, 5+	ST +, 1+
4	<i>Cystoderma terreii</i>	ST +, 0	ST +, 3+	ST +, 2+
5	<i>Hebeloma circinans</i>	ST +, 1+	ST 0, 4+	ST +, 2+
6	<i>Hygrophorus pratensis</i>	ST +, 2+	ST +, 4+	ST +, 2+
7	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	ST +, 1+	ST +, 3+	ST +, 3+
8	<i>Oudemansiella mucida</i>	ST +, 1+	ST 0, 4+	ST +, 1+
9	<i>Psathyrella multipedata</i>	ST +, 3+	ST +, 4+	ST +, 2+
10	<i>Rhodocybe gemina</i> (14.10.2007)	ST +, 0	ST +, 4+	ST +, 2+
11	<i>Rhodocybe gemina</i> (10.10.2008)	ST +, 0	ST +, 4+	ST +, 2+
12	<i>Tricholoma album</i>	ST +, 3+	ST +, 4+	ST +, 2+
13	<i>Tricholoma sejunctum</i>	ST +, 2+	ST +, 4+	ST +, 0
14	<i>Tricholomopsis decora</i>	ST +, 2+	ST +, 5+	ST +, 2+
	Detekovatelné skupiny	UV $\lambda=254$	UV $\lambda=254$	UV $\lambda=366$

Číslo vzorku	Taxon	D 2, S 2	D 3, S 1	D 3, S 2	D 4, S 1	D 4, S 2	D 5, S 1
1	<i>Amanita crocea</i>	ST +, 1+	ST +, 3+	ST +, 2+	ST +, 3+	ST +, 3+	ST +, 1+
2	<i>Bolbitius vitellinus</i>	ST +, 2+	ST +, 5+	ST +, 2+	ST +, 3+	ST +, 2+	ST +, 1+
3	<i>Cortinarius traganus</i>	ST +, 1+	ST +, 4+	ST +, 4+	ST +, 1+	ST 0, 1+	ST +, 0
4	<i>Cystoderma terrei</i>	ST +, 1+	ST +, 1+	ST +, 2+	ST +, 1+	ST +, 1+	ST +, 0
5	<i>Hebeloma circinans</i>	ST +, 1+	ST +, 3+	ST +, 3+	ST +, 2+	ST 0, 2+	ST +, 0
6	<i>Hygrophorus pratensis</i>	ST +, 3+	ST +, 3+	ST +, 1+	ST +, 3+	ST +, 3+	ST +, 1+
7	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	ST +, 2+	ST +, 3+	ST +, 3+	ST +, 3+	ST +, 2+	ST +, 0
8	<i>Oudemansiella mucida</i>	ST +, 1+	ST +, 2+	ST +, 2+	ST 0, 1+	ST 0, 0	ST +, 0
9	<i>Psathyrella multipedata</i>	ST +, 4+	ST +, 4+	ST +, 2+	ST +, 3+	ST +, 3+	ST +, 1+
10	<i>Rhodocybe gemina (14.10.2007)</i>	ST +, 1+	ST +, 2+	ST +, 3+	ST +, 3+	ST +, 2+	ST +, 1+
11	<i>Rhodocybe gemina (10.10.2008)</i>	ST +, 1+	ST +, 5+	ST +, 3+	ST +, 2+	ST +, 2+	ST +, 1+
12	<i>Tricholoma album</i>	ST +, 4+	ST +, 6+	ST +, 2+	ST +, 3+	ST +, 2+	ST +, 1+
13	<i>Tricholoma sejunctum</i>	ST +, 1+	ST +, 7+	ST +, 3+	ST 0, 5+	ST 0, 1+	ST +, 1+
14	<i>Tricholomopsis decora</i>	ST +, 1+	ST +, 3+	ST +, 2+	ST +, 2+	ST +, 2+	ST +, 1+
	Detekovatelné skupiny	UV $\lambda=366$	Steroly, steroidy, triterpeny	Steroly, steroidy, triterpeny	Cukry, steroidy, terpeny	Cukry, steroidy, terpeny	Fenolické sloučeniny

Číslo vzorku	Taxon	D 5, S 2	D 6, S 1	D 6, S 2	D 7, S 1	D 7, S 2	D 8, S 1
1	<i>Amanita crocea</i>	ST +, 1+	ST +, 2+	ST +, 3+	ST +, 0	ST +, 0	ST +, 0
2	<i>Bolbitius vitellinus</i>	ST +, 0	ST +, 2+	ST +, 4+	ST +, 0	ST 0, 0	ST +, 0
3	<i>Cortinarius traganus</i>	ST +, 0	ST +, 0	ST +, 3+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST +, 0
4	<i>Cystoderma terreii</i>	ST +, 1+	ST +, 1+	ST +, 1+	ST +, 0	ST +, 0	ST +, 0
5	<i>Hebeloma circinans</i>	ST +, 1+	ST +, 1+	ST 0, 2+	ST +, 0	ST 0, 0	ST +, 0
6	<i>Hygrophorus pratensis</i>	ST +, 2+	ST +, 1+	ST +, 1+	ST +, 0	ST 0, 0	ST +, 0
7	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	ST +, 2+	ST +, 0	ST +, 2+	ST +, 0	ST +, 0	ST +, 0
8	<i>Oudemansiella mucida</i>	ST +, 1+	ST +, 0	ST +, 2+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST +, 0
9	<i>Psathyrella multipedata</i>	ST +, 2+	ST +, 2+	ST +, 2+	ST +, 1+	ST +, 0	ST +, 1+
10	<i>Rhodocybe gemina (14.10.2007)</i>	ST +, 2+	ST +, 1+	ST +, 2+	ST +, 0	ST 0, 0	ST +, 0
11	<i>Rhodocybe gemina (10.10.2008)</i>	ST +, 2+	ST +, 0	ST +, 2+	ST +, 0	ST 0, 0	ST +, 0
12	<i>Tricholoma album</i>	ST +, 0	ST +, 0	ST +, 2+	ST +, 0	ST +, 0	ST +, 0
13	<i>Tricholoma sejunctum</i>	ST +, 0	ST +, 1+	ST +, 2+	ST +, 0	ST 0, 0	ST +, 0
14	<i>Tricholomopsis decora</i>	ST +, 1+	ST +, 0	ST +, 2+	ST +, 0	ST +, 0	ST +, 0
	Detekovatelné skupiny	Fenolické sloučeniny	Cukry	Cukry	Alkaloidy	Alkaloidy	Fenolické sloučeniny

Číslo vzorku	Taxon	D 8, S 2	D 9, S 1	D 9, S 2	D 10, S 1	D 10, S 2	D 11, S 1
1	<i>Amanita crocea</i>	ST 0, 0	ST +, 1+	ST +, 2+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST 0, 0
2	<i>Bolbitius vitellinus</i>	ST 0, 0	ST +, 1+	ST +, 3+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST 0, 0
3	<i>Cortinarius traganus</i>	ST 0, 0	ST +, 1+	ST +, 3+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST 0, 0
4	<i>Cystoderma terrei</i>	ST 0, 0	ST +, 1+	ST +, 3+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST 0, 0
5	<i>Hebeloma circinans</i>	ST 0, 0	ST +, 1+	ST +, 3+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST 0, 0
6	<i>Hygrophorus pratensis</i>	ST 0, 0	ST +, 1+	ST +, 4+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST 0, 0
7	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	ST 0, 0	ST +, 1+	ST +, 4+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST 0, 0
8	<i>Oudemansiella mucida</i>	ST 0, 0	ST +, 1+	ST +, 4+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST 0, 0
9	<i>Psathyrella multipedata</i>	ST 0, 0	ST +, 1+	ST +, 4+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST 0, 0
10	<i>Rhodocybe gemina (14.10.2007)</i>	ST 0, 0	ST +, 1+	ST +, 5+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST 0, 0
11	<i>Rhodocybe gemina (10.10.2008)</i>	ST 0, 0	ST +, 1+	ST +, 3+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST 0, 0
12	<i>Tricholoma album</i>	ST +, 0	ST +, 1+	ST +, 1+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST 0, 0
13	<i>Tricholoma sejunctum</i>	ST 0, 0	ST +, 1+	ST +, 3+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST 0, 0
14	<i>Tricholomopsis decora</i>	ST 0, 0	ST +, 1+	ST +, 3+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST 0, 0
	Detekovatelné skupiny	Fenolické sloučeniny	Karboxylové kyseliny	Karboxylové kyseliny	Redukující látky	Redukující látky	Laktony

Číslo vzorku	Taxon	D 11, S 2	D 12, S 1	D 12, S 2	D 13, S 1	D 13, S 2	D 14, S 1
1	<i>Amanita crocea</i>	ST 0, 0	ST +, 0	ST +, 1+	ST +, 5+	ST +, 3+	ST +, 1+
2	<i>Bolbitius vitellinus</i>	ST 0, 0	ST +, 0	ST +, 1+	ST +, 6+	ST +, 1+	ST +, 0
3	<i>Cortinarius traganus</i>	ST 0, 0	ST +, 0	ST +, 1+	ST +, 7+	ST 0, 4+	ST +, 1+
4	<i>Cystoderma terreii</i>	ST 0, 0	ST +, 0	ST +, 2+	ST +, 2+	ST +, 2+	ST +, 0
5	<i>Hebeloma circinans</i>	ST 0, 0	ST +, 0	ST 0, 0	ST +, 2+	ST 0, 2+	ST +, 0
6	<i>Hygrophorus pratensis</i>	ST 0, 0	ST +, 0	ST +, 2+	ST +, 4+	ST +, 2+	ST +, 0
7	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	ST 0, 0	ST +, 0	ST +, 2+	ST +, 2+	ST +, 3+	ST +, 1+
8	<i>Oudemansiella mucida</i>	ST 0, 0	ST +, 0	ST 0, 0	ST +, 1+	ST 0, 1+	ST +, 0
9	<i>Psathyrella multipedata</i>	ST 0, 0	ST +, 0	ST +, 1+	ST +, 5+	ST +, 2+	ST +, 0
10	<i>Rhodocybe gemina (14.10.2007)</i>	ST 0, 0	ST +, 0	ST +, 2+	ST +, 3+	ST +, 2+	ST +, 0
11	<i>Rhodocybe gemina (10.10.2008)</i>	ST 0, 0	ST +, 0	ST +, 1+	ST +, 3+	ST +, 2+	ST +, 0
12	<i>Tricholoma album</i>	ST 0, 0	ST +, 0	ST +, 1+	ST +, 4+	ST +, 2+	ST +, 0
13	<i>Tricholoma sejunctum</i>	ST 0, 0	ST +, 0	ST +, 1+	ST 0, 5+	ST 0, 1+	ST +, 0
14	<i>Tricholomopsis decora</i>	ST 0, 0	ST +, 0	ST 0, 0	ST +, 2+	ST +, 3+	ST +, 0
	Detekovateľné skupiny	Laktóny	Amino-kyseliny	Amino-kyseliny	Steroly	Steroly	Amino-kyseliny

Číslo vzorku	Taxon	D 14, S 2	D 15, S 1	D 15, S 2	D 16, S 1	D 16, S 2
1	<i>Amanita crocea</i>	ST +, 3+	ST +, 0	ST +, 0	ST +, 4+	ST +, 4+
2	<i>Bolbitius vitellinus</i>	ST +, 3+	ST +, 0	ST +, 0	ST +, 4+	ST +, 4+
3	<i>Cortinarius traganus</i>	ST +, 2+	ST +, 0	ST 0, 0	ST +, 7+	ST +, 5+
4	<i>Cystoderma terreii</i>	ST +, 2+	ST +, 0	ST +, 1+	ST +, 3+	ST +, 3+
5	<i>Hebeloma circinans</i>	ST +, 1+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST +, 2+	ST +, 3+
6	<i>Hygrophorus pratensis</i>	ST +, 3+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST +, 4+	ST +, 3+
7	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	ST +, 3+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST +, 4+	ST +, 3+
8	<i>Oudemansiella mucida</i>	ST +, 1+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST +, 4+	ST +, 3+
9	<i>Psathyrella multipedata</i>	ST +, 3+	ST +, 0	ST +, 1+	ST +, 5+	ST +, 3+
10	<i>Rhodocybe gemina (14.10.2007)</i>	ST +, 3+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST +, 2+	ST +, 3+
11	<i>Rhodocybe gemina (10.10.2008)</i>	ST +, 3+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST +, 4+	ST +, 3+
12	<i>Tricholoma album</i>	ST +, 2+	ST +, 0	ST +, 0	ST +, 4+	ST +, 3+
13	<i>Tricholoma sejunctum</i>	ST +, 3+	ST 0, 0	ST 0, 0	ST +, 5+	ST +, 3+
14	<i>Tricholomopsis decora</i>	ST +, 3+	ST +, 0	ST +, 0	ST +, 3+	ST +, 2+
	Detekovatelné skupiny	Amino-kyseliny	Fenoly, aminy	Fenoly, aminy	Fenoly, steroidy, vyšší alkoholy	Fenoly, steroidy, vyšší alkoholy

4. STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY DPPH TESTEM S VYUŽITÍM SIA

4.1. Postup práce

Byl připraven $1 \cdot 10^{-4}$ M roztok DPPH radikálu. Roztok byl získán rozpuštěním 3,9 mg DPPH v 60 ml 95% EtOH v 100 ml hnědé odměrné baňce a doplněním do 100 ml superčistou vodou. Roztok byl odvzdušněn v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut a byl chráněn před světlem. Jako rozpouštědlo pro přípravu vzorků, jako slepý vzorek a jako nosný proud v systému byl použit 50% EtOH (tato metoda byla v naší laboratoři optimalizována pro výše uvedené rozpouštědlo). Měřený vzorek byl připraven rozpuštěním cca 4 mg lyofilizátu v 50% EtOH, aby vznikla koncentrace 1 mg/ml. Dále byly ředěním připraveny koncentrace 0,5, 0,25, 0,1 mg/ml. Všechny připravené koncentrace byly odvzdušněny v ultrazvukové lázni. Před měřením vzorku byla změřena nejprve absorbance slepého vzorku. Měření vzorku bylo naprogramováno na 3 měření po sobě, čímž byly získány 3 hodnoty. Po nasátí roztoku DPPH přístrojem SIA mezi dvě zóny měřeného vzorku, resp. slepého vzorku, došlo k reakci. Byla změřena absorbance při $\lambda = 525$ nm.

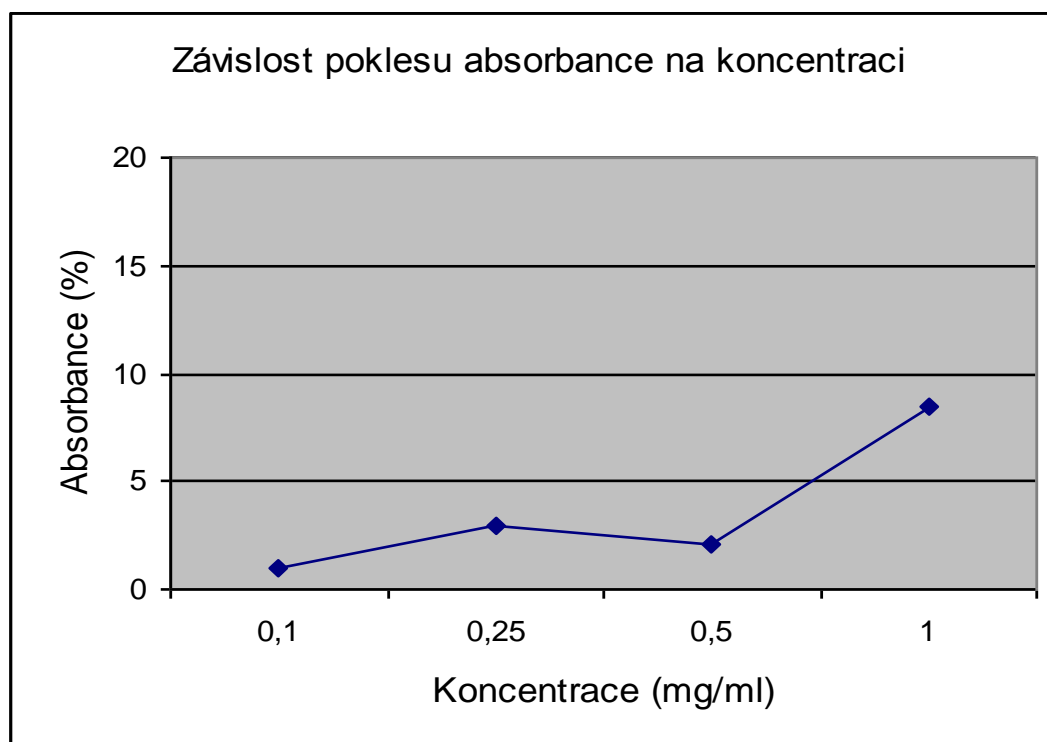
Antioxidační účinek byl vyjádřen v % poklesu absorbance oproti slepému vzorku dle vzorce $\%Q = (1 - A_X/A_0) \cdot 100$, kde A_X je výška píku měřeného vzorku a A_0 je výška píku slepého vzorku. Pro porovnání jednotlivých antioxidantů bývá uváděna hodnota EC_{50} , což je koncentrace potřebná pro snížení absorbance o 50 %. Za použití metody stanovení antioxidační aktivity DPPH testem s využitím SIA byly již dříve získány tyto hodnoty pro standardní antioxidanty – 0,006 mg/ml pro kyselinu askorbovou a 0,014 pro trolox (Macáková, 2009). U žádného z testovaných vzorků hub nebyla aktivita tak vysoká, aby bylo možné vypočítat hodnotu EC_{50} .

Hodnoty naměřených antioxidačních aktivit u sledovaných taxonů

Tabulka 4: *Amanita crocea* (Quél.) Kühner & Romang.

Koncentrace (mg/ml)	Pokles absorbance (%)
0,1	0,96
0,25	3,00
0,5	2,05
1	8,46

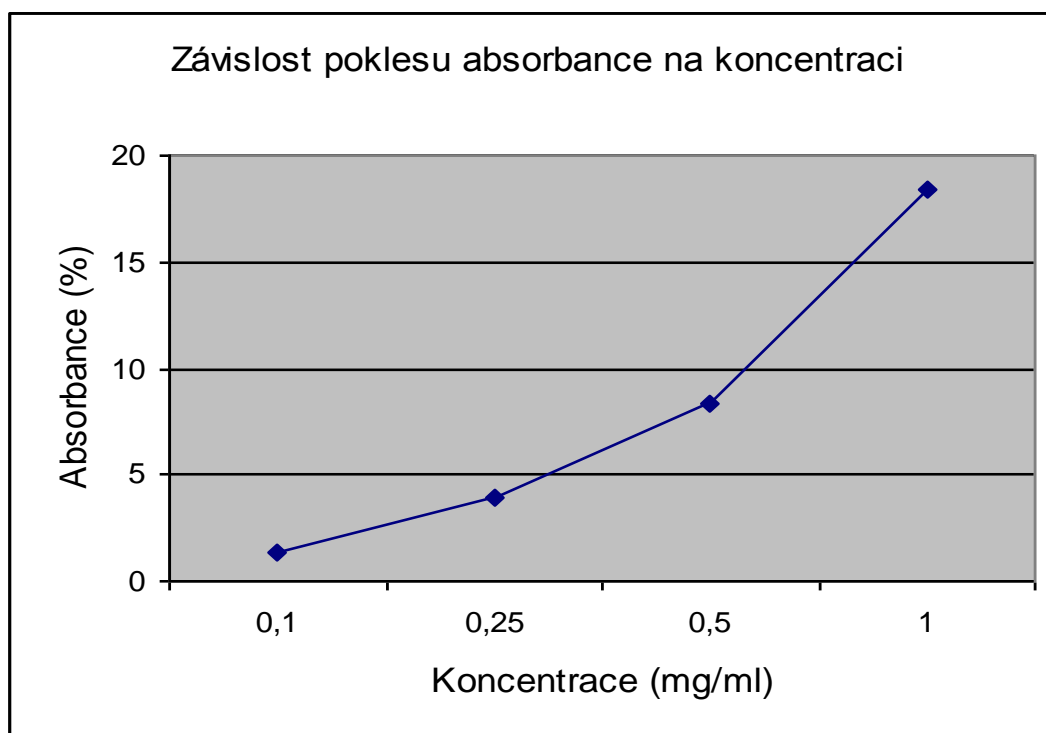
Graf 1: *Amanita crocea* (Quél.) Kühner & Romang.



Tabulka 5: *Bolbitius vitellinus* (Pers.) Fr.

Koncentrace (mg/ml)	Pokles absorbance (%)
0,1	1,41
0,25	3,92
0,5	8,38
1	18,41

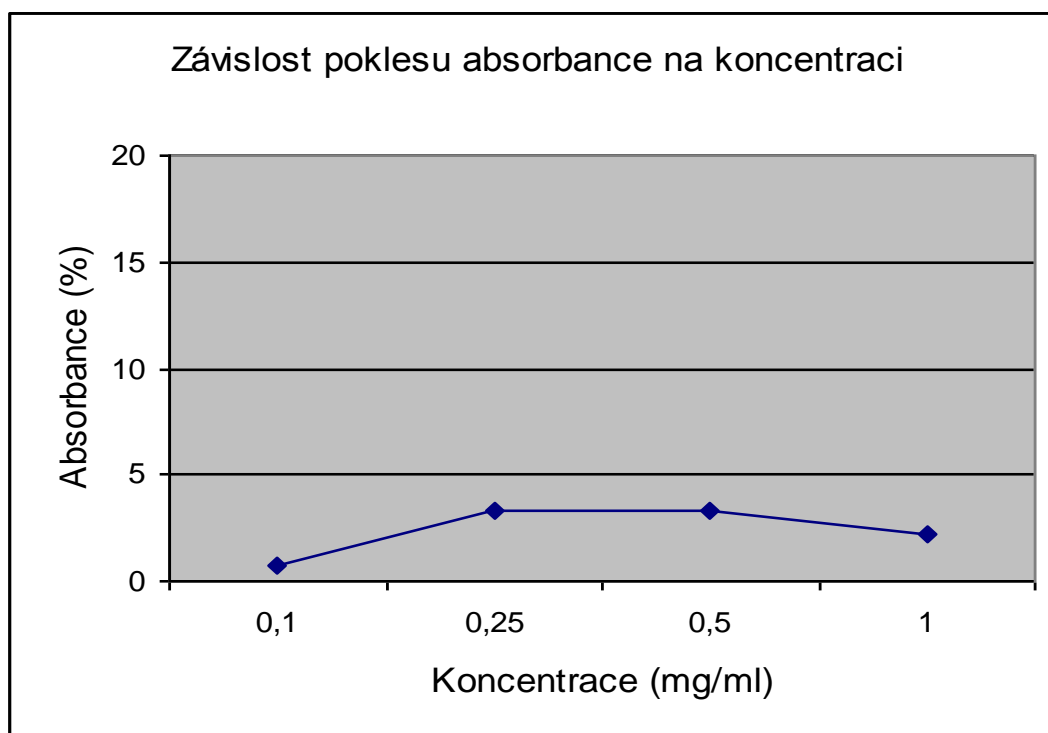
Graf 2: *Bolbitius vitellinus* (Pers.) Fr.



Tabulka 6: *Cortinarius traganus* (Fr. ex Fr.) Fr.

Koncentrace (mg/ml)	Pokles absorbance (%)
0,1	0,7
0,25	3,31
0,5	3,30
1	2,17

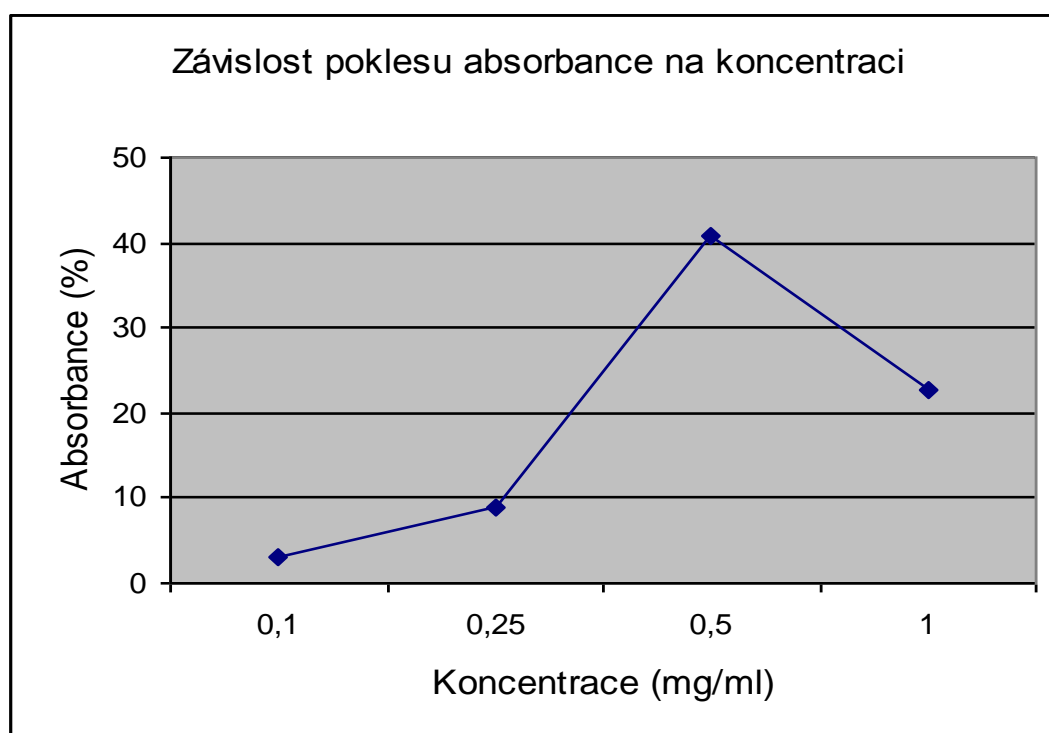
Graf 3: *Cortinarius traganus* (Fr. ex Fr.) Fr.



Tabulka 7: *Cystoderma terreii* (Berk. & Broome) Hatmaja

Koncentrace (mg/ml)	Pokles absorbance (%)
0,1	3,15
0,25	8,93
0,5	40,88
1	22,74

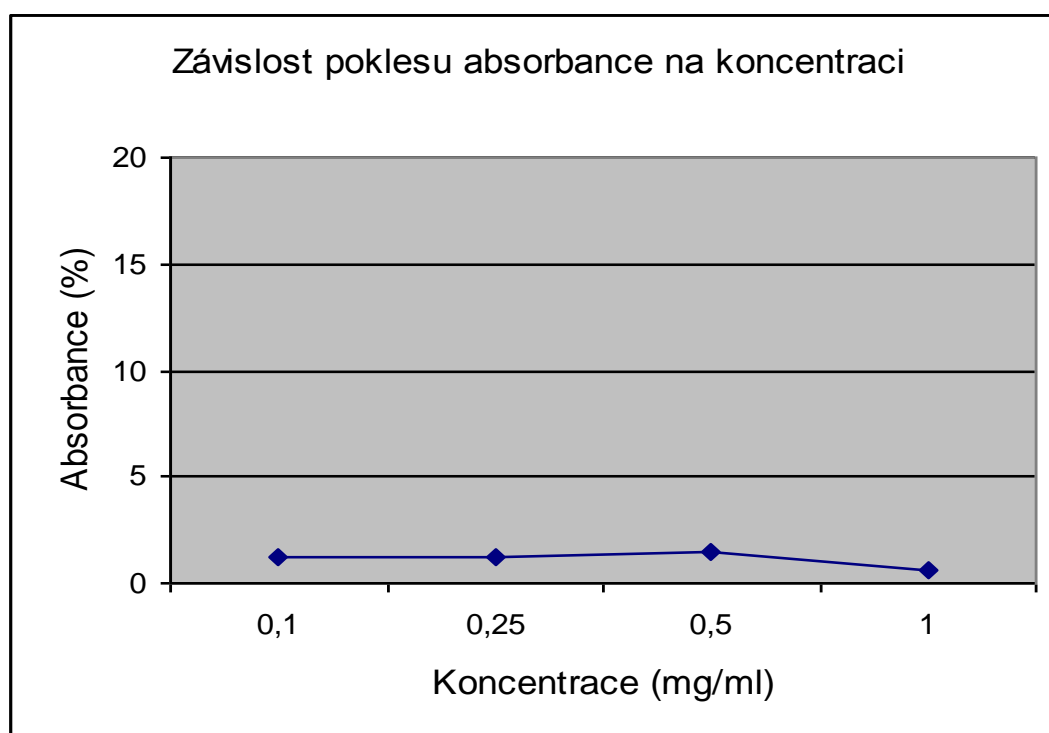
Graef 4: *Cystoderma terreii* (Berk. & Broome) Hatmaja



Tabulka 8: *Hebeloma circinans* (Quél.) Sacc.

Koncentrace (mg/ml)	Pokles absorbance (%)
0,1	1,22
0,25	1,20
0,5	1,48
1	0,61

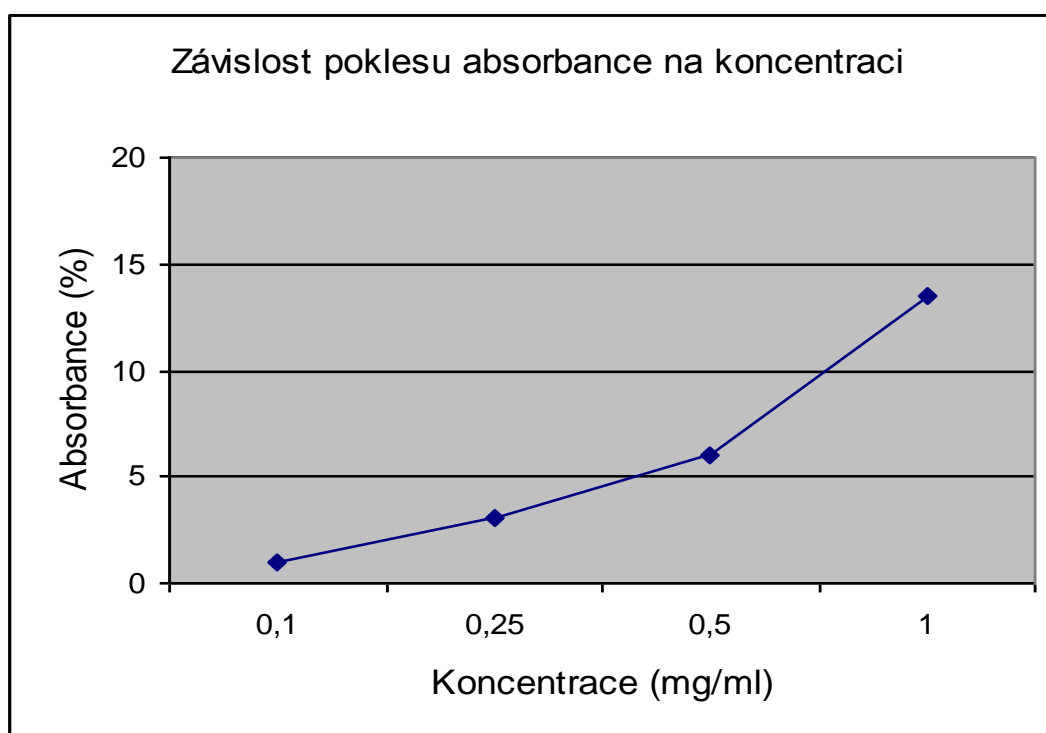
Graf 5: *Hebeloma circinans* (Quél.) Sacc.



Tabulka 9: *Hygrophorus pratensis* (Pers.) Fr.

Koncentrace (mg/ml)	Pokles absorbance (%)
0,1	1,04
0,25	3,10
0,5	6,01
1	13,49

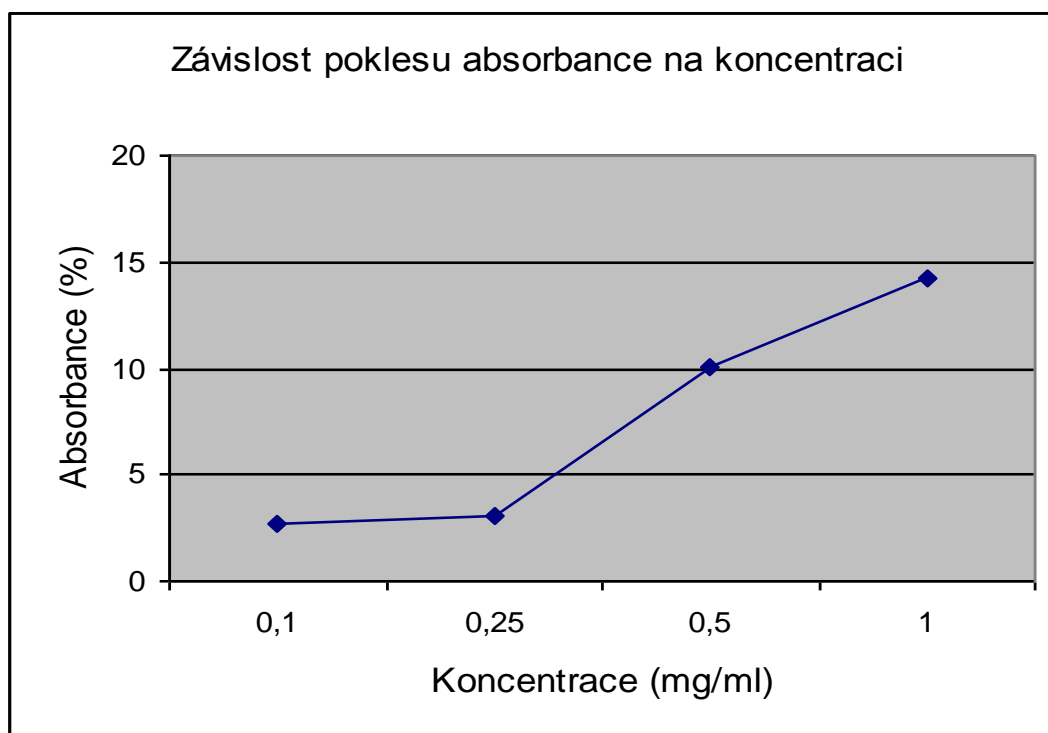
Graf 6: *Hygrophorus pratensis* (Pers.) Fr.



Tabulka 10: *Lycoperdon pyriforme* Schaeff.

Koncentrace (mg/ml)	Pokles absorbance (%)
0,1	2,72
0,25	3,04
0,5	10,02
1	14,28

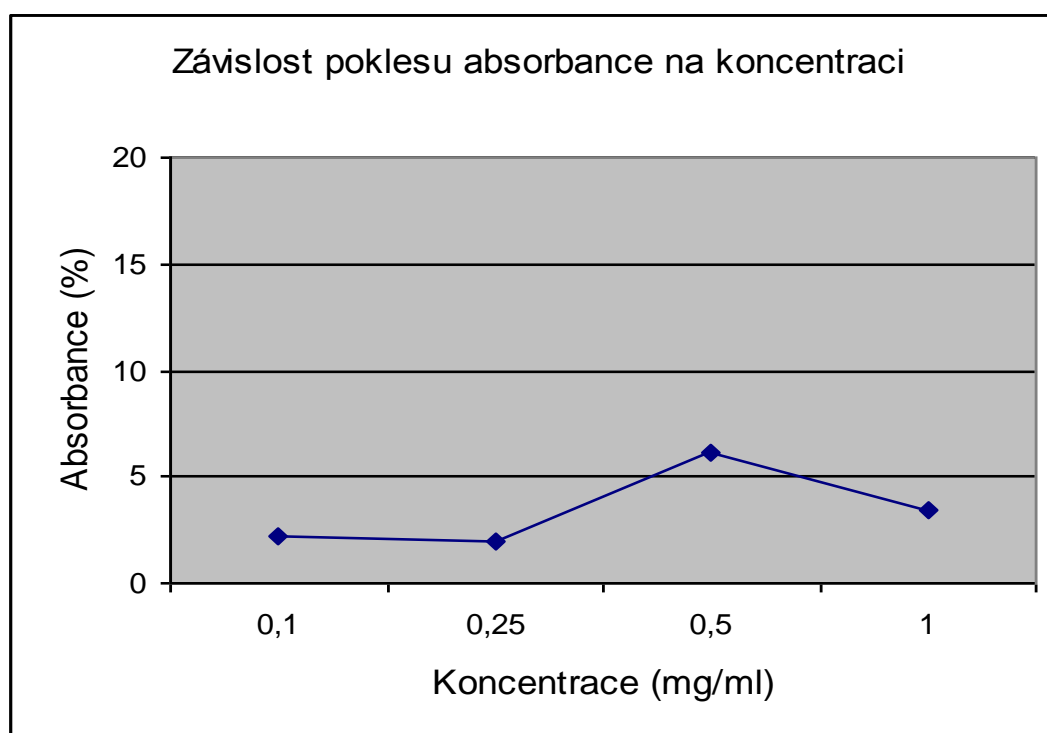
Graf 7: *Lycoperdon pyriforme* Schaeff.



Tabulka 11: *Oudemansiella mucida* (Schröd. ex Fr.) Höhn.

Koncentrace (mg/ml)	Pokles absorbance (%)
0,1	2,23
0,25	1,94
0,5	6,14
1	3,41

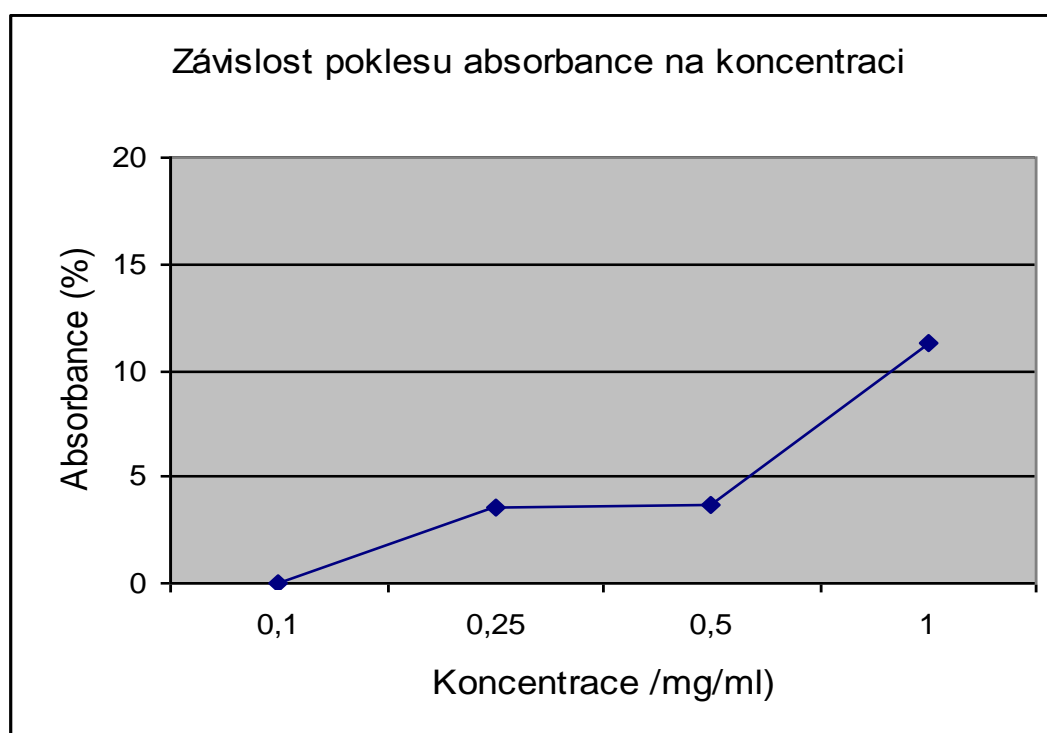
Graf 8: *Oudemansiella mucida* (Schröd. ex Fr.) Höhn.



Tabulka 12: *Psathyrella multipedata* (Peck) A. H. Sm.

Koncentrace (mg/ml)	Pokles absorbance (%)
0,1	0
0,25	3,53
0,5	3,64
1	11,30

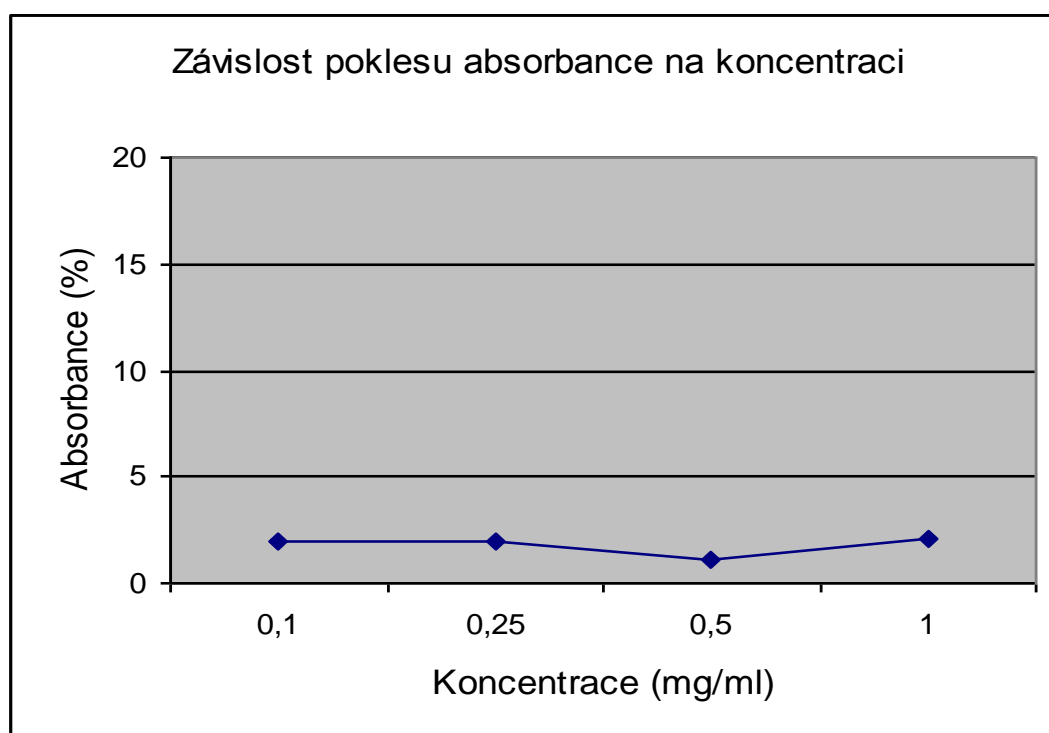
Graf 9: *Psathyrella multipedata* (Peck) A. H. Sm.



Tabulka 13: *Rhodocybe gemina* (Fr.) Kuyper & Noordel. (14.10.2007)

Koncentrace (mg/ml)	Pokles absorbance (%)
0,1	1,98
0,25	2,02
0,5	1,15
1	2,03

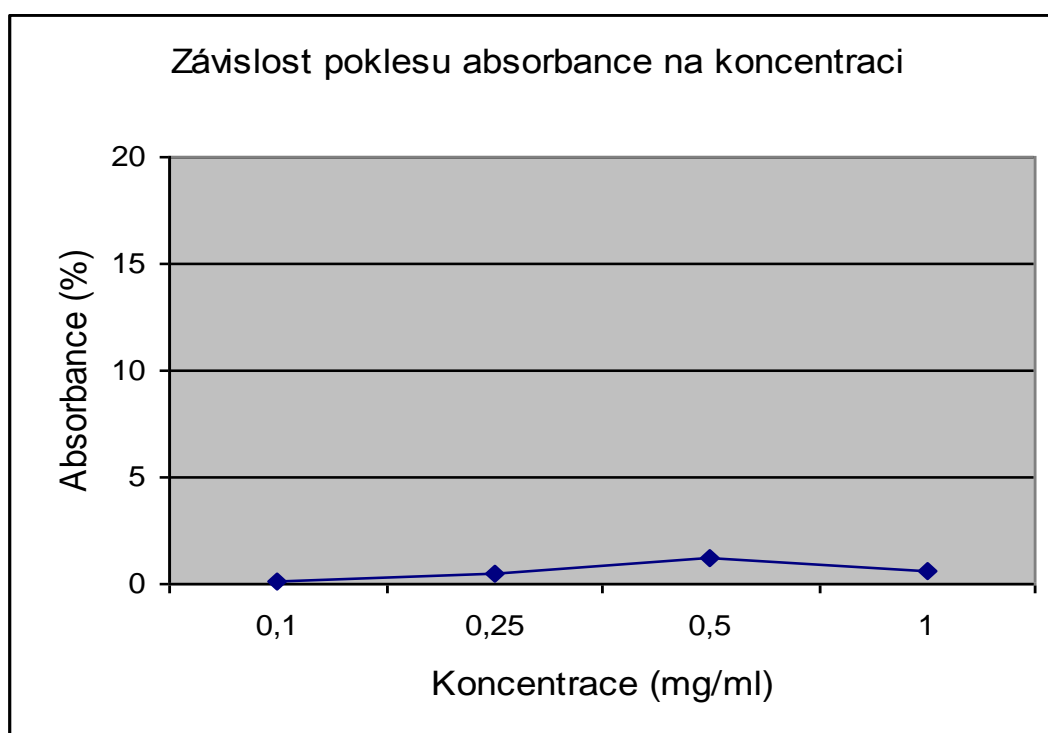
Graf 10: *Rhodocybe gemina* (Fr.) Kuyper & Noordel. (14.10.2007)



Tabuka 14: *Rhodocybe gemina* (Fr.) Kuyper & Noordel. (10.10.2008)

Koncentrace (mg/ml)	Pokles absorbance (%)
0,1	0,14
0,25	0,53
0,5	1,17
1	0,59

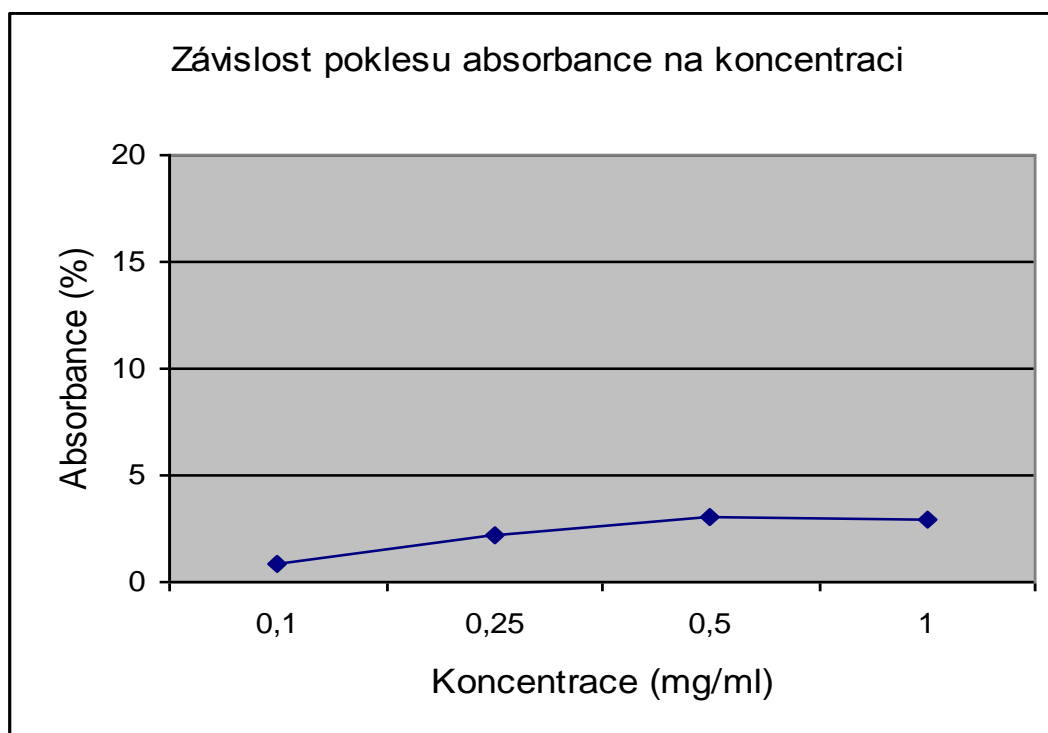
Graf 11: *Rhodocybe gemina* (Fr.) Kuyper & Noordel. (10.10.2008)



Tabulka 15: *Tricholoma album* (Schaeff.) P. Kumm

Koncentrace (mg/ml)	Pokles absorbance (%)
0,1	0,85
0,25	2,18
0,5	3,04
1	2,88

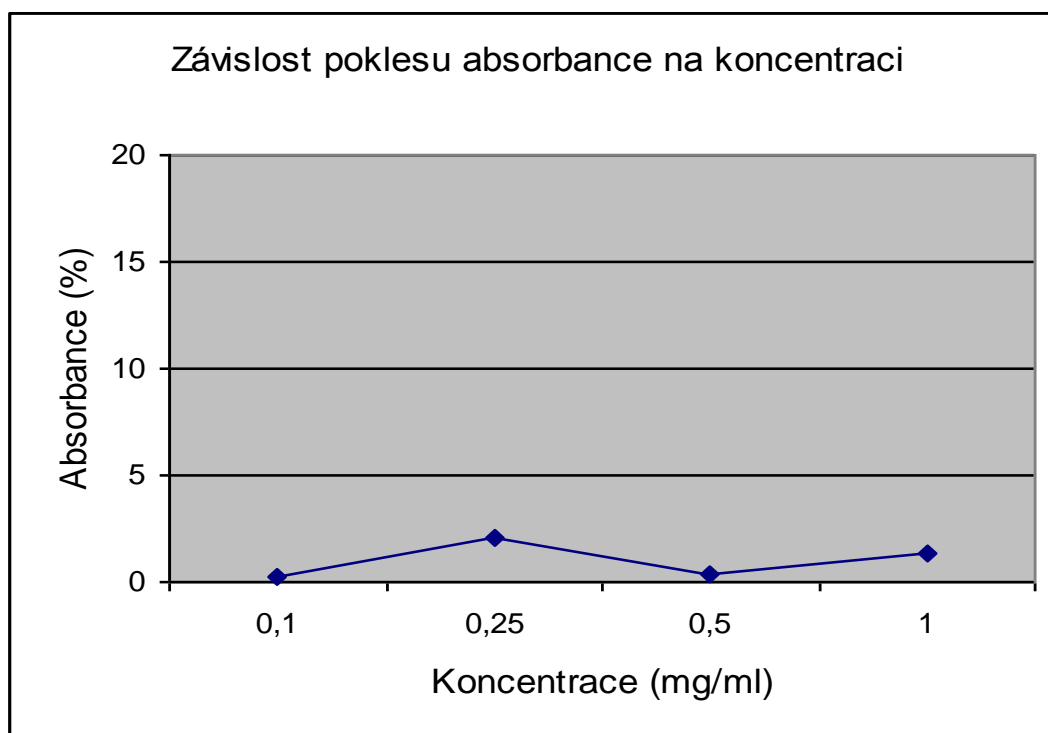
Graf 12: *Tricholoma album* (Schaeff.) P. Kumm



Tabulka 16: *Tricholoma sejunctum* (Sowerby) Quéf.

Koncentrace (mg/ml)	Pokles absorbance (%)
0,1	0,22
0,25	2,03
0,5	0,42
1	1,39

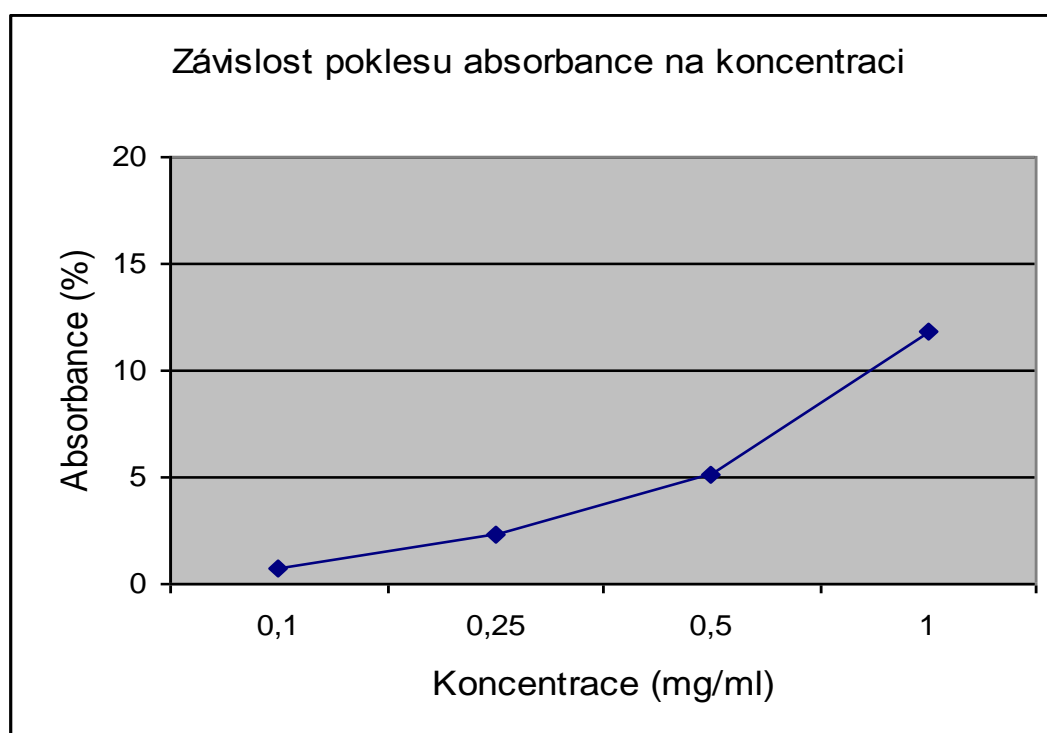
Graf 13: *Tricholoma sejunctum* (Sowerby) Quéf.



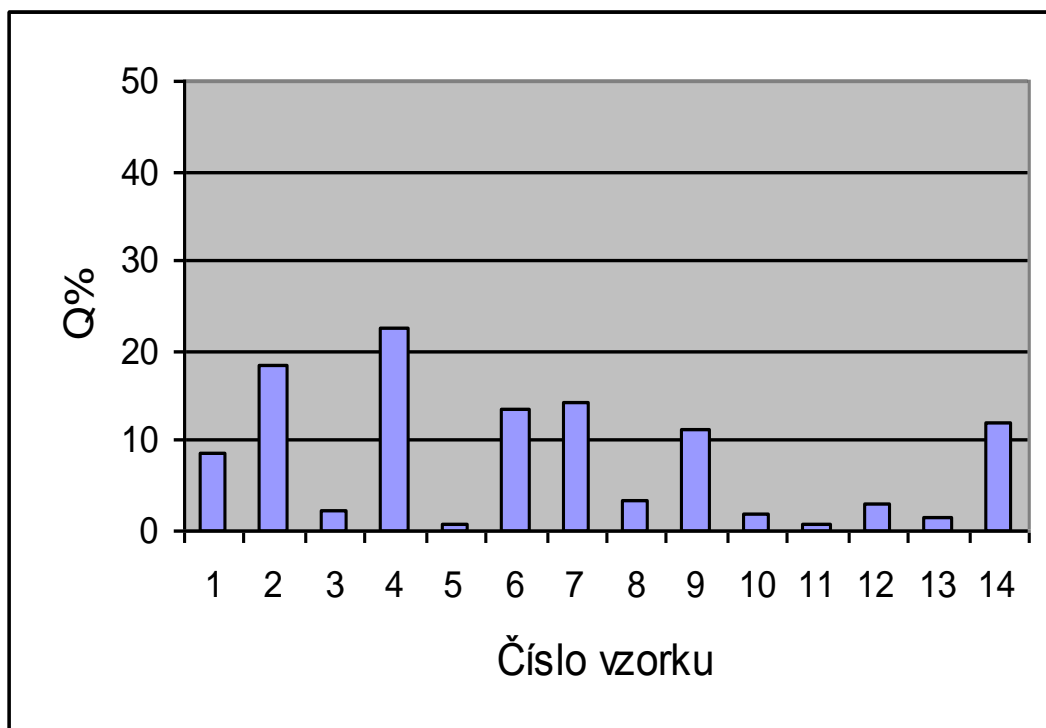
Tabulka 17: *Tricholomopsis decora* (Fr.) Sing.

Koncentrace (mg/ml)	Pokles absorbance (%)
0,1	0,75
0,25	2,26
0,5	5,09
1	11,89

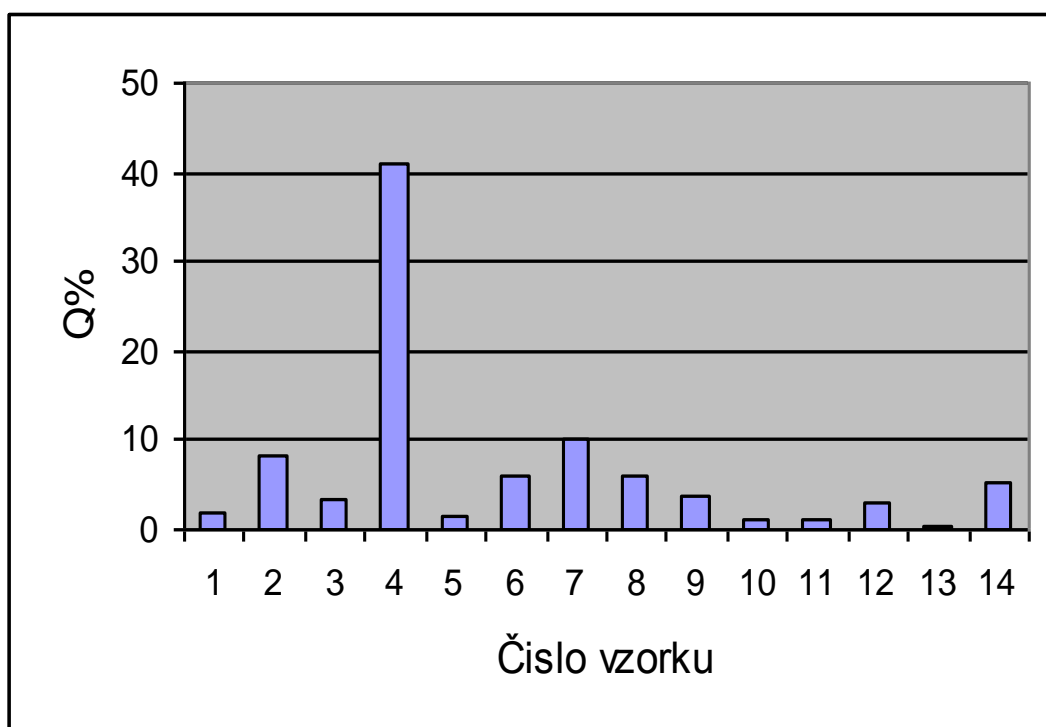
Graf 14: *Tricholomopsis decora* (Fr.) Sing.



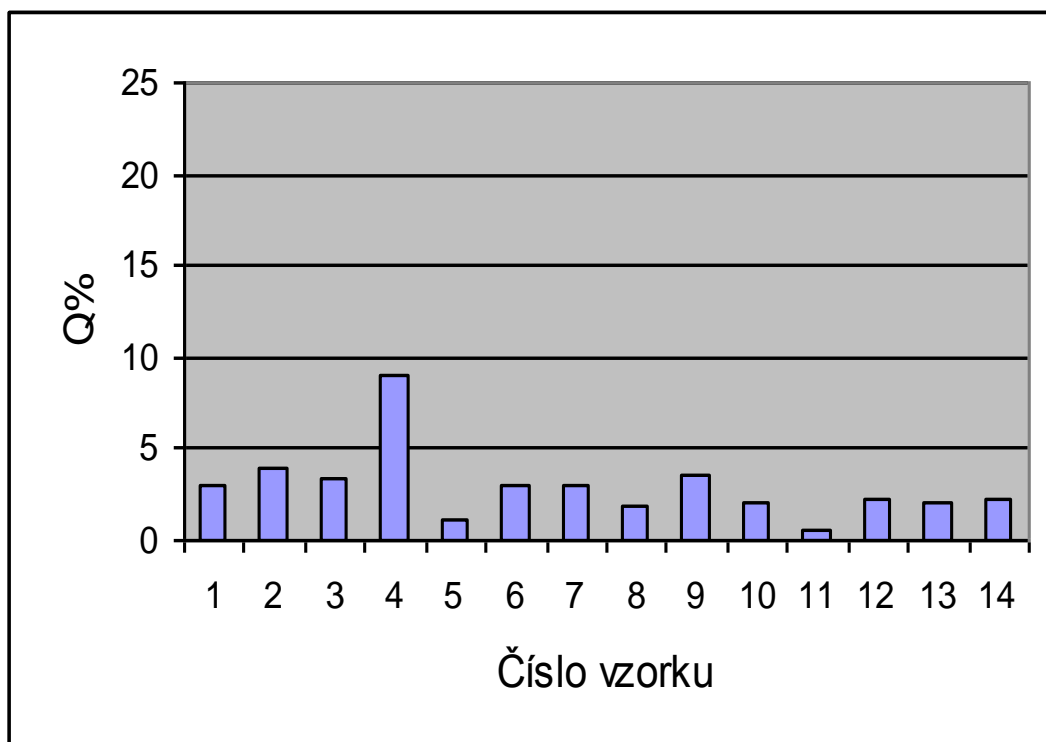
Graf 15: Porovnání antioxidační aktivity taxonů při koncentraci 1 mg/ml



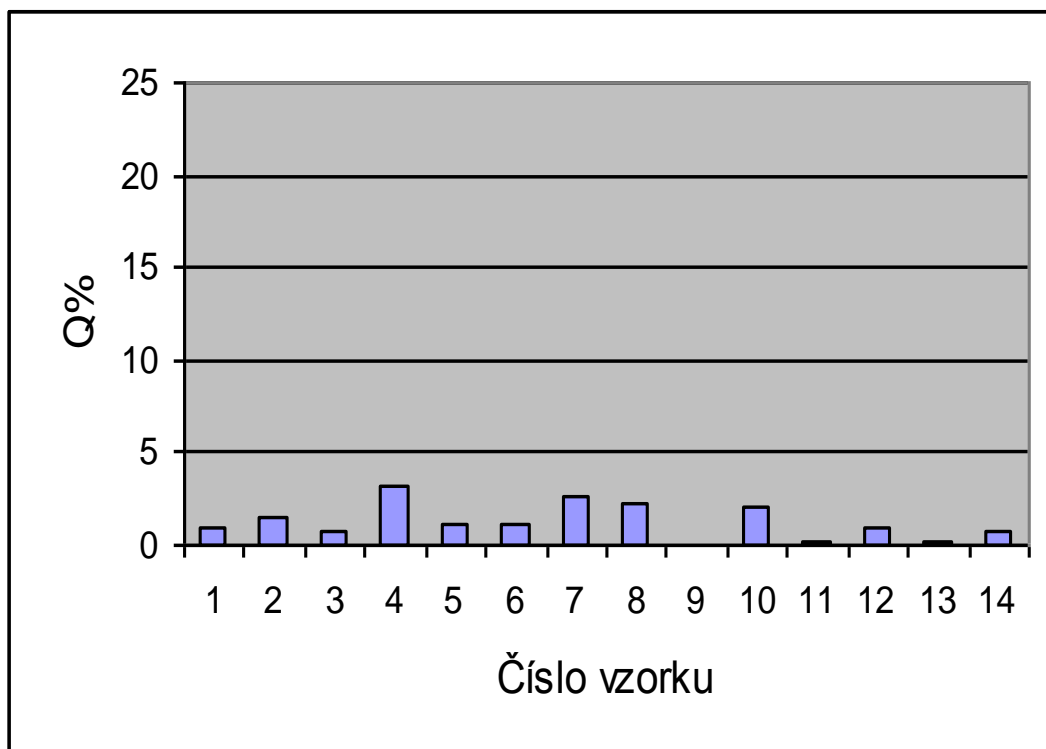
Graf 16: Porovnání antioxidační aktivity taxonů při koncentraci 0,5 mg/ml



Graf 17: Porovnání antioxidační aktivity taxonů při koncentraci 0,25 mg/ml



Graf 18: Porovnání antioxidační aktivity taxonů při koncentraci 0,1 mg/ml



V. DISKUZE

Tato diplomová práce byla vytvořena s cílem zjistit taxony hub, které vykazují signifikantní hodnoty antioxidační aktivity. Práce je součástí fytochemického výzkumu vyšších hub, probíhajícího na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie. Je součástí prvotního screeningu a v budoucnu může být použita jako pomůcka k izolaci a identifikaci sloučenin s antioxidační aktivitou či jiných sloučenin, které jsou v houbách obsaženy.

Antioxidanty jsou látky, které působí proti oxidačnímu stresu. Oxidační stres vzniká v organismu při nadbytku volných radikálů reaktivních forem kyslíku a dusíku. Ty mají za následek vznik a rozvoj mnoha degenerativních chorob jako např. nádorová onemocnění, diabetes mellitus, autoimunitní poškození, Parkinsonova nemoc, skleróza multiplex, Alzheimerova nemoc, demyelinizační nemoc, svalová dystrofie, peptický vřed, pankreatitida, Crohnova nemoc, nefrotický syndrom, urémie, ateroskleróza, infarkt myokardu a další. Antioxidanty se mohou uplatnit v prevenci i terapii těchto chorob. Jsou součástí běžné stravy, celé řady potravních doplňků a také jsou obsaženy v některých druzích hub (Kameníková, 2000/2001).

Houby jsou také zdrojem mnoha aminokyselin, minerálních látek a vitamínů. Vlákna, nacházející se v houbách, příznivě ovlivňuje peristaltiku a vyprazdňování střev. Díky své nízké výživové hodnotě jsou vhodné jako dietetikum. Jednou z negativních vlastností hub je jejich schopnost akumulovat toxické kovy, čímž nepříznivě ovlivňují pochody v organismu. Některé druhy hub obsahují toxické látky jako např. amanitiny v muchomůrce zelené, aflatoxiny v kropidláku žlutém, peniciliny ve štětičkovci žlutozeleném, kyseliny lysergová v paličkovci nachové a *Claviceps paspali*. Určité látky produkované houbami jsou využívány v medicíně. Jsou to např. ergotové alkaloidy z rodu *Claviceps*, fumigatin a fumagilin z *Aspergillus fumigatus*, griseofulvin z *Penicillium patulum*, *P. griseofulvum* a *P. nigricans*, cefalosporin z druhu *Emericellopsis minimum* (Klán, 1989; Kovář, 1999; Kubát, 1998).

U druhu *O. mucida* byl izolován mucidin s antifungálním účinkem (Von Jagow, 1986) a u druhu *L. pyriforme* 4-methoxy-benzen-1-azoformamid; 4-methoxybenzen-1-ONN-azoxyformamid; 3,5-dichloro-4-methoxybenzen-1-ONN-azoxyformamid (Koepcke, 1999). U ostatních sledovaných druhů hub zatím nebyly čisté látky

izolovány. Obsahové látky jednotlivých rodů hub, které byly doposud izolovány, jsou uvedeny v tabulce 1.

Použitým zkoumaným materiálem byly plodnice hub. Ty byly zmrazeny tekutým dusíkem a do zpracování uchovávány v plastických sáčkách při teplotě $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$, dále rozdrceny pomocí mixéru a extrahovány 70% EtOH sonikací v ultrazvukové lázni. 70% EtOH byl použit jako optimální rozpouštědlo na základě předchozích pokusů. Extrakty byly zahuštěny na vakuové rotační odparce a poté následovala lyofilizace. Lyofilizovaný extrakt byl přeplněn do penicilinek, převrstven argonem a uzavřen. Takto připravené extrakty byly uchovávány v mrazničce a byly výchozím materiálem pro stanovení antioxidační aktivity a pro hodnocení obsahových látek tenkovrstvou chromatografií. Ani při tomto postupu však nelze zaručit v lyofilizátu přítomnost všech látek, které se vyskytují v čerstvých houbách, protože v průběhu zpracování plodnic může docházet k rozkladu některých obsahových látek.

Lyofilizací byly získány práškovité lyofilizáty. Pouze vzorek č. 11 (*R. gemina*, sbíráno roku 2008) byl vysoce viskózní. Lyofilizáty byly dobře rozpustné v 70% EtOH. Tyto vzorky byly velmi světle hnědě zbarveny.

K vyhodnocení ethanolických extraktů hub byla provedena tenkovrstvá chromatografie (TLC) a selektivními detekcemi byly identifikovány jednotlivé skupiny obsahových látek. Soustavy, které byly použity při vyvíjení, vzešly z předchozích experimentů. Soustava S 1 (toluen + HCOOEt + HCOOH = 50 + 40 + 10) slouží k separaci méně polárních látek. Soustava S 2 (PrOH + voda = 90 + 10) je vhodná pro látky polární.

Na základě provedených tenkovrstvých chromatografií je možné vyvodit následující závěry:

Obsah polárních i méně polárních látek byl u všech taxonů poměrně vyrovnaný.

Z primárních metabolitů je nejvýraznější výskyt aminokyselin. Jak již bylo řečeno v kapitole Chemická skladba hub, aminokyseliny jsou součástí plazmy houbových buněk (Semerdžieva, 1986). U sledovaných rodů, jako např. *Tricholomopsis*, byly již některé aminokyseliny izolovány a blíže identifikovány (Niimura, 1974; Hatanaka, 1976). Aminokyseliny byly prokázány pomocí detekce D 14: Ninhydrin – kolidin (obrázek 43, 44). Tyto látky, které se vyskytly ve všech lyofilizátech, jsou lépe zřetelné po použití soustavy S 2. Také po detekci D 12: Isatin - octan zinečnatý (obrázek 39, 40) byly aminokyseliny detekovány téměř

ve všech lyofilizátech kromě *H. circinans*, *O. mucida* a *T. decora*. Opět byly lépe zřetelné za použití soustavy S 2. Sacharidy jsou běžnou součástí plazmy a také jsou složkami buněčných stěn hub (Semerdžieva, 1986). Výskyt sacharidů je u sledovaných druhů rovněž výrazný a téměř ve všech vzorcích shodný, jak je možné odvodit z detekce D 6: Difenylamin - anilin - kyselina fosforečná (obrázek 27, 28). Detekci D 4: Anisaldehyd – kyselina sírová (obrázek 23, 24) je možno použít nejen pro detekci cukrů, ale také steroidů a terpenů, což lze zjistit z rozdílu při použití chromatografických soustav.

Z hlediska výskytu sekundárních metabolitů byla provedena detekce na laktony. U rodu *Psathyrella* byl již izolován monoterpenový lakton – scobilolid (Gadir, 1986). Avšak pomocí detekce D 11: Hydroxylamin – chlorid železitý (obrázek 37, 38) nebyla u sledovaných druhů zjištěna žádná pozitivní reakce.

Detekce na alkaloidy (D 7: Dragendorffovo činidlo podle Muniera, obrázek 29, 30) byla zřetelnější za použití soustavy S 1. U taxonu *P. multipedata* byla zjištěna pozitivní reakce i na dráze. Negativní reakce na startu byla pouze u taxonu *C. traganus* a *O. mucida*. U některých vzorků se může jednat o falešně pozitivní reakci.

Při detekci na karboxylové kyseliny (D 9: Glukosa – anilin, obrázek 33, 34) došlo k pozitivní reakci jak na startu, tak na drahách u všech sledovaných taxonů. V soustavě S 2 byly však reakce na drahách lépe detekovatelné. U rodu *Amanita*, *Hebeloma*, *Hygrophorus*, *Tricholoma* a *Tricholomopsis* jsou tyto pozitivní reakce ve shodě s publikovanými výsledky (Dossena, 1996; Hrdina, 2004; Nozoe, 1982; Ribeiro, 2006; Teichert, 2005).

Fenolické antioxidanty jsou přítomny u rodu *Cystoderma* (Giridhar, 2001) a fenolické sloučeniny u rodu *Tricholoma* (Kawagishi, 2004). U těchto dvou rodů byla prokázána přítomnost fenolických sloučenin také detekcí D 5, D 10 a D 15. Při detekci na fenolické látky D 5: 2,6-Dibromchinonchlorimid (Gibbsovo činidlo, obrázek 25, 26) byla v soustavě S 1 pozitivní reakce na startu u všech taxonů a na dráze byla pozitivní reakce u všech taxonů kromě *C. traganus*, *C. terrei*, *H. circinans*, *L. pyriforme* a *O. mucida*. V soustavě S 2 byly opět na startu všechny reakce pozitivní a pozitivní reakce na dráze byla u všech taxonů kromě *B. vitellinus*, *C. traganus*, *T. album*, *T. sejunctum*. U detekce D 10: Hexakynoželezitan draselný – chlorid železitý (obrázek 35, 36) byly všechny reakce negativní (i přes opakované provedení této detekce). Tento negativní výsledek může být však způsoben

nevyhovujícími vlastnostmi některého z činidel. Proto výsledek této detekce nelze považovat za reprezentativní. Při detekci D 8: Fast Blue B salt (obrázek 31, 32) za použití soustavy S 1 došlo k pozitivní reakci na startu u všech vzorků a na dráze pouze u *P. multipedata*. Za použití soustavy S 2 byla reakce pozitivní pouze na startu u *T. album*.

U další detekce na fenoly a aminy D 15: Paulyho činidlo (diazotovaná kyselina sulfanilová) (obrázek 45, 46) byla reakce na startu pozitivní u taxonů *A. crocea*, *B. vitellinus*, *C. terreii*, *P. multipedata*, *T. album* a *T. decora* za použití soustavy S 2 a u soustavy S 1 také u *C. traganus*. Na dráze byla pozitivní reakce pouze v soustavě S 2 a to u *C. terreii* a *P. multipedata*.

Detekce na fenoly, steroidy a vyšší alkoholy D 16: Vanilin – kyselina sírová (obrázek 47, 48) byla v soustavě S 1 i S 2 u všech vzorků pozitivní jak na startu, tak na dráze.

Obsah steroidů a sterolů byl prokázán u rodu *Tricholoma* (Hata, 2002) a rodu *Tricholomopsis* (Wang, 2005), což je v souladu s výsledky detekce D 13. U detekce D 16 nelze s jistotou říci, zda jde o pozitivní reakce právě na steroidy nebo zda se jedná o fenoly či vyšší alkoholy. Z hlediska detekce sterolů (D 13: 1,2-Naftochinon-4-sulfonová kyselina-kyselina chloristá, obrázek 41, 42) bylo dosaženo pozitivních reakcí v obou soustavách na startu kromě *T. sejunctum* v soustavě S 1 a *C. traganus*, *H. circinans*, *O. mucida* a *T. sejunctum* v soustavě S 2. Na drahách byly pozitivní reakce u všech taxonů v obou soustavách.

Při detekci D 3: Acetanhydrid-kyselina sírová (Liebermann-Burchardovo činidlo) na steroly, steroidy a triterpeny byla pozitivní reakce u všech taxonů v obou soustavách jak na startu, tak na dráze (obrázek 21, 22). Steroidy a steroly byly již dříve izolovány z rodu *Tricholoma* (Hata, 2002) a *Tricholomopsis* (Wang, 2005), jak bylo zmíněno v předchozím odstavci. Triterpeny byly prokázány u rodu *Hebeloma* - lanostanové triterpeny - hebelomová kyselina B, E, F (Garlaschelli, 1995) a rodu *Tricholoma* - trichomycin A, B (Ovenden, 2005). S určitostí však nelze říci, zda detekce D 3 je ve shodě s publikovanými výsledky, protože není možné přesně rozlišit pozitivní reakce pro jednotlivé typy látek.

Z tohoto hodnocení vyplývá, že v lyofilizátech jsou obsaženy především látky typu fenolů, sterolů, cukrů, aminokyselin a karboxylových kyselin.

Při screeningu antioxidační aktivity byla použita metoda, při níž se využívá znalosti barevné reakce mezi DPPH radikálem a antioxidantem (dochází k odbarvení

DPPH radikálu v důsledku interakce s analytem). Metoda patří mezi nejpoužívanější při jednoduchém screeningu antioxidační aktivity přírodních látek. Je nenáročná a snadno proveditelná.

Instrumentální metoda, která byla použita v této práci, využívá možností SIA za použití přístroje FIALab 3000 analyzátor (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA). Díky své rychlosti a malému množství vzorku, nutného pro zjištění antioxidační aktivity, je vhodná pro vykonávání rutinních testování ve velkých sériích lyofilizovaných houbových extraktů. Koncentrace, které byly použity v tomto testu, se pohybovaly v rozmezí od 0,1 až 1,0 mg/ml lyofilizátu.

Nejvyšší antioxidační aktivitu jevil extrakt z *C. terrei* (tabulka 7, graf 4), což lze předpokládat, protože z tohoto rodu byly již dříve izolovány fenolické antioxidy (Giridhar, 2001), jako druhý nejúčinnější extrakt z *B. vitellinus* (tabulka 5, graf 2) a jako třetí extrakt z *L. pyriforme* (tabulka 10, graf 7). Méně aktivní byly extrakty z *H. pratensis* (tabulka 9, graf 6), *T. decora* (tabulka 17, graf 14), *P. multipedata* (tabulka 12, graf 9), *A. crocea* (tabulka 4, graf 1), *O. mucida* (tabulka 11, graf 8). Velmi málo aktivní byly extrakty z *C. traganus* (tabulka 6, graf 3), *T. album* (tabulka 15, graf 12), *R. gemina* (sbíráno roku 2007, tabulka 13, graf 10), *T. sejunctum* (tabulka 16, graf 13), *H. circinans* (tabulka 8, graf 5) a *R. gemina* (sbíráno roku 2008, tabulka 14, graf 11). Žádný z testovaných druhů nebyl doposud podroben stanovení antioxidační aktivity. Exponenciální průběh křivek vykazovaly pouze extrakty z *B. vitellinus*, *H. pratensis*, *L. pyriforme*, *P. multipedata* a *T. decora*. Extrakty z ostatních druhů exponenciální průběh nevykazovaly. U některých vzorků byla nejvyšší aktivita při koncentraci 0,5 mg/ml, což mohou způsobit dva jevy:

1. roztoky některých vzorků nebyly při koncentraci 1 mg/ml zcela čiré a tím nemohla být absorbance správně změřena (skutečná absorbance je nižší než naměřená),
2. některé roztoky extraktů byly při koncentraci 1 mg/ml výrazně zbarveny a tím mohla být naměřená absorbance také zvýšena.

Při porovnání se standardními antioxidy (Macáková, 2009) jsou naměřené hodnoty antioxidační aktivity natolik nízké, že není vhodné tyto houby a extrakty z nich považovat za možný zdroj antioxidačně aktivních látek.

VI. LITERATURA

ANTONÍN, V. *Encyklopedie hub a lišejníků*. 1. vyd. Praha: Libri: Academia, 2006. 472 s. ISBN 80-7277-164-7 (Libri), ISBN 80-200-1476-4 (Academia). s. 325.

BIELLI, E. *Houby: obsáhlý rádce pro určování a sběr hub*. 1. vyd. Praha: Ikar: Knižní klub, 2001. 224 s. ISBN 80-242-0548-3. s. 13, 14, 26, 27, 28, 29, 30, 35.

BOCCHI, M., GARLASCHELLI, L., VIDARI, G., MERLLERIO, G. New farnesane sesquiterpenes from *Hebeloma senescens*. *Journal of Natural Products*, 1992, vol. 55, s. 428-31.

BOOM, M. MykoWeb, 2008

(http://www.mykoweb.com/CAF/species/Camarophyllus_pratensis.html), čerpáno dne 27.10.2009

DE BERNARDI, M., GARLASCHELLI, L., TOMA, L., VIDARI, G., VITA-FINZI, P. Fungal metabolites. XXVI. The structure of saponaceolides B, C and D, new C-30 terpenoids from *Tricholoma saponaceum*. *Tetrahedron*, 1991, vol. 47, s. 7109-16.

DOSSENA, A., LUNGHI, A., GARLASCHELLI, L., VIDARI, G. The structure and absolute configuration of two novel triterpene depsipeptides from the fruiting bodies of *Hebeloma senescens*. *Tetrahedron, Asymmetry*, 1996, vol. 7. s. 1911-1914.

ERHARTOVI, J. a M. *Houbařský atlas: 400 druhů jedlých a jedovatých hub*. 1. vyd. Vimperk: Tina, 1995. ISBN 80-85618-31-1. č. 121, 211, 218, 305.

FUJIMOTO, H., MAEDA, K., YAMAZAKI, M. New toxic metabolites from a mushroom, *Hebeloma vinosophyllum*. III. Isolation and structure of three new glycosides, hebevinosides XII, XIII and XIV, and productivity of hebevinosides at three growth stages of the mushroom. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1991, vol. 39, s. 1958-61.

GADIR, S. A., SMITH, Y., TAHY, A., THALLER, V. Isolation and synthesis of scobinolide, a new monoterpene lactone from cultures of the fungus *Psathyrella scobinacea* (Fr.) Konr. and Maubl. *Journal of Chemical Research, Synopses*, 1986, s. 102-3.

GARLASCHELLI, L., PANG, Z., STERNER, O., VIDARI, G. New indole derivatives from the fruit bodies of *Tricholoma sciodes* and *T. virgatum*. *Tetrahedron*, 1994, vol. 50, s. 3571-4.

GARLASCHELLI, L., VIDARI, G., VITA-FINZI, P. Tricholomenyns C, D, and E, novel dimeric dienyne geranyl cyclohexenones from the fruiting bodies of *Tricholoma acerbum*. *Tetrahedron Letters*, 1996, vol. 37, s. 6223-6226.

GARLASCHELLI, L., VIDARI, G., VIRTUANI, M., VITA-FINZI, P., MELLERIO, G. The structures of new lanostane triterpenes from the fruiting bodies of *Hebeloma senescens*. *Journal of Natural Products*, 1995, vol. 58, s. 992-1002.

GILARDONI, G., CLERICUZIO, M., TOSI, S., ZANONI, G., VIDARI, G. Antifungal acylcyclopentenenediones from fruiting bodies of *Hygrophorus chrysodon*. *Journal of Natural Products*, 2007, vol. 70, s. 137-139.

GIRIDHAR, P., REDDY, S. M. Phenolic antioxidant for the control of some mycotoxigenic fungi. *Journal of Food Science and Technology*. 2001, vol. 38, s. 397-399.

GRÜNERTOVÍ, H. a R. *Houby*. Praha: Knižní klub: Ikar, 1995. 287 s. ISBN 80-7176-183-4 (Knižní klub), ISBN 80-85830-91-4 (Ikar). s. 54, 112, 144, 252.

GUO, Y., WANG, H., NG, T. B. Isolation of trichogin, an antifungal protein from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides (New York, NY, United States)*, 2005, vol. 26, s. 575-580.

GUTÉN, S. Swefungi – Swedish Fungi, 2009

(http://www.swefungi.se/PAGES_DH/Hebeloma_circinans.html), čerpáno dne 27.10.2009

HAGARA, L., ANTONÍN, V., BAIER, J. *Houby*. 2. vyd. Praha: Aventinum, 2000. 471 s. ISBN 80-7151-131-5. s. 288.

HATA, K., SUGAWARA, F., OHISA, N., TAKAHASHI, S., HORI, K. Stimulative effects of (22E,24R)-ergosta-7,22-diene-3 β ,5 α ,6 β -triol from fruiting bodies of *Tricholoma auratum*, on a mouse osteoblastic cell line, MC3T3-E1. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2002, vol. 25, s. 1040-1044.

HATANAKA, S., NIIMURA, Y. Biochemical studies on nitrogen compounds of fungi. X. Isolation and characterization of L-3-(4-carboxy-3-furyl)alanine from *Tricholomopsis rutilans*. *Scientific Papers of the College of General Education*, University of Tokyo, 1975, vol. 25, s. 35-7.

HATANAKA, S., NIIMURA, Y., TANIGUCHI, K., KINOSHITA, F., KATAYAMA, H. Specific amino acids in some edible mushrooms. *Mushroom Science*, 1976, vol. 9, s. 809-13.

HRDINA, V. , HRDINA, R. , JAHODÁŘ, L. , MARTINEC, Z. , MĚRKA, V. Přírodní toxiny a jedy. Praha: Galén : Karolinum, 2004. 302 s. ISBN 80-7262-256-0 (Galén), ISBN 80-246-0823-5 (Karolinum), s. 123-126.

JUNEK¹, M. Biolib – Biological Library, 2005

(<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id8291/?taxonid=60511>), čerpáno dne 27.10.2009

JUNEK², M. Biolib – Biological Library, 2005

(<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id8870/?taxonid=60389>), čerpáno dne 27.10.2009

KAMENÍKOVÁ, L. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. *Solutio*, 2000/2001 s. 31 – 49.

KAWAGISHI, H., TONOMURA, Y., YOSHIDA, H., SAKAI, S., INOUE, S. Orirubenones A, B and C, novel hyaluronan-degradation inhibitors from the mushroom *Tricholoma orirubens*. *Tetrahedron*, 2004, vol. 60, s. 7049-7052.

KEIZER, G. J. *Encyklopedie hub*. Praha: Rebo Productions, 1998. 288 s. ISBN 80-85815-95-8. s. 11, 18, 21, 22, 29, 151, 167 – 168, 168, 169, 187, 216, 234, 235, 250.

KLÁN, J. *Co víme o houbách*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989. 312 s. ISBN 80-04-21143-7. s. 108, 109 – 110, 110, 112, 113, 114, 115.

KLÁN, J. *Houby*. 1. české vyd. Praha: Aventinum, 1999. 223 s. ISBN 80-7151-068-8. s. 12, 13.

KOEPCKE, B., MAYER, A., ANKE, H., STERNER, O. Bioactive azo- and azoxyformamides from *Lycoperdon pyriforme*. *Natural Product Letters*, 1999, vol. 13, s. 41-46.

KOHE, H. W. *Atlas hub: 150 druhů jedlých i nejedlých hub*. 1. vyd. Praha: Ikar, 2000. 192 s. ISBN 80-7202-624-0. s. 6, 7, 8, 9, 164.

KOMÁR, J. Nahuby.sk, 2009
(http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=170180), čerpáno dne 27.10.2009

KOVÁŘ, L. *Breviř o houbách*. 1. vyd. Praha: Olympia, 1999. 160 s. ISBN 80-7033-593-9. s. 29, 45 – 46, 107, 108, 109, 110, 111.

KUBÁT, K., KALINA, T., KOVÁČ, J., KUBÁTOVÁ, D., PRACH, K., URBAN, Z. *Botanika*. 1. vyd. Praha: Scientia, 1998. 231 s. ISBN 80-7183-053-4. s. 23, 43.

LAESSØE, T. *Houby*. 1. vyd. Praha: Knižní klub, 2004. 304 s. s. 96.

MACÁKOVÁ, K., OPLETAL, L., POLÁŠEK, M., SAMKOVÁ, V. JAHODÁŘ, L. Free-radical Scavenging Activity of some European Boletales. *Natural Product Communications*, 2009, vol. 4, s. 261-264.

MALÝ, J. Nahuby.sk, 2007
(http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=76280), čerpáno dne 27.10.2009

Manuál k přístroji FIALab 3000 analyser (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA), přeloženo z anglického jazyka.

MIKULCOVÁ, M. *Výchova houbařů v Čechách, aneb, Co v atlasech nenajdete*. 1. vyd. Praha: Olympia, 2006. 208 s. ISBN 80-7033-960-8. s. 118.

MUSZYNSKA, B., SULKOWSKA-ZIAJA, K., EKIERT, H. Indole compounds in fruiting bodies of some selected Macromycetes species and in their mycelia cultured in vitro. *Pharmazie*, 2009, vol. 64, s. 479-480.

NEJESCHLEBA, V. Biolib – Biological Library, 2009
(<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id107248/?taxonid=126017>), čerpáno dne 27.10.2009

NIIMURA, Y., HATANAKA, S. Biochemical studies on nitrogen compounds of fungi. Part 15. Two γ -glutamylpeptides of acetylenic amino acids in *Tricholomopsis rutilans*. *Phytochemistry*, 1977, vol. 16, s. 1435-6.

NIIMURA, Y., KINOSHITA, F., HATANAKA, S. Biochemical studies on nitrogen compounds of Fungi. VII. Nonprotein amino acids of five species in the genus *Tricholomopsis*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 1974, vol. 15, s. 218-22.

NOZOE, S., TAKAHASHI, A., KUSANO, G., ITAI, A., IITAKA, Y. Tricholidic acid, a new triterpene lactonic acid from *Tricholoma species*. *Chemistry Letters*, 1982, s. 1679-80.

OPLETAL¹, L., KOULA, V. Daidalea Verze 1.0 – internetová databáze, 2005 (<http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/MycoSpecies.asp?id=10063>), čerpáno dne 27.10.2009

OPLETAL², L., KOULA, V. Daidalea Verze 1.0 – internetová databáze, 2005 (<http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/MycoSpecies.asp?id=10155>), čerpáno dne 27.10.2009

OPLETAL³, L., KOULA, V. Daidalea Verze 1.0 – internetová databáze, 2005 (<http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/MycoSpecies.asp?id=10341>), čerpáno dne 27.10.2009

OPLETAL⁴, L., KOULA, V. Daidalea Verze 1.0 – internetová databáze, 2005 (<http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/MycoSpecies.asp?id=10674>), čerpáno dne 27.10.2009

ORTEMBERGOVÁ, A. *Mládne s antioxidanty*. 1. vyd. Praha: Ivo Železný, 2003. 126 s. ISBN 80-237-3742-2. s. 11, 12-13.

OVENDEN, S. P. B., YU, J., BERNAYS, J., WAN, S. S., CHRISTOPHIDIS, L. J., SBERNA, G., TAIT, R. M., WALDMAN, H. G., LEBELLER, D., PLATEL, D., MAY, T. W., MEURER-GRIMES, B. M. Trichomycins A and B: Antibacterial triterpenes from the new species *tricholoma* sp. AU1. *Journal of Natural Products*, 2005, vol. 68, s. 409-412.

PACHON-PENA, G., REYES-ZURITA, F. J., DEFFIEUS, G., AZQUETA, A., DE CERAIN, A. L., CENTELLES, J. J., CREPPY, E. E., CASCANTE, M. Antiproliferative effect of flavomannin-6,6'-dimethylether from *Tricholoma equestre* on Caco-2 cells. *Toxicology*, 2009, vol. 264, s. 192-197.

PALMA, N., KNAUSEDER, F. Pleuromutilin related metabolites produced by submerged culture of the basidiomycetous genus *Clitopilus* Kummer. *Eur. Congr. Biotechnol.*, 3rd, 1984, vol. 1, s. 533-42.

POLÁŠEK, M., SKÁLA, P., OPLETAL, L., JAHODÁŘ, L. Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379, 2004, s. 754-758.

PŘÍHODA, A., URBAN, L., URBAN, L. ml. *Kapesní atlas hub, 1. díl*. 2. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1988. 255 s. s. 36, 37, 96, 124, 226.

RACEK, J. *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. 1. vyd. Praha: Galén, 2003. 90 s. ISBN 80-7262-231-5. s. 9, 11.

RIBEIRO, B., RANGEL, J., VALENTAO, P., BAPTISTA, P., SEABRA, R. M., ANDRADE, P. B. Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, vol. 54, s. 8530-8537.

SAKAI, S., TOMOMURA, Y., YOSHIDA, H., INOUE, S., KAWAGISHI, H. Orirubenones D to G, novel phenones from the *Tricholoma orirubens* mushroom. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, vol. 69, s. 1630-1632.

SEMERDŽIEVA, M., VESELSKÝ, J. *Léčivé hoby dříve a nyní*, 1. vyd. Praha: Academia, 1986. 180 s. s. 34, 35, 43.

SMOTLACHA, M. *Smotlachův atlas hub: oficiální příručka pro určování jedlých a jedovatých hub*. 4. vyd. Praha: Ottovo nakladatelství, 1999. 271 s. ISBN 80-7181-311-7. s. 31.

STAHL, E. *Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook*. Springer Berlin, Berlin-Heidelberg-New York 1969. s. 1042.

SVRČEK, M. *Houby*. 1. české vyd. Praha: Aventinum nakladatelství, 1997. 279 s. ISBN 80-7151-026-2. s. 19, 24, 25, 38, 39, 40, 41, 106, 122, 132, 146, 172.

ŠKUBLA, P. *Velký atlas hub*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo Príroda, 2007. 432 s. ISBN 978-80-07-01501-2. s. 242.

ŠTÍPEK, S. BOROVSANÝ, J., ČEJKOVÁ, J. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000. 320 s. ISBN 80-7169-704-4. s. 22, 58-66.

ŠANŠŮNOVÁ, M., SCHWARZ, V. (ed). *Chromatografia na tenkých vrstvách vo farmácii a v klinickej biochémií*. 2. vyd. Martin: Osveta, 1977, 520 s.

TEBBETT, I. R. Cyclic decapeptides in kidney. *Methodological Surveys in Biochemistry and Analysis*. 1986, vol. 16, s. 13-16.

TEICHERT, A., LUEBKEN, T., SCHMIDT, J., PORZEL, A., ARNOLD, N., WESSJOHANN, L. Unusual bioactive 4-oxo-2-alkenoic fatty acids from *Hygrophorus eburneus*. *Zeitschrift fuer Naturforschung, B: Chemical Sciences*, 2005, vol. 60, s. 25-32.

TSUKAMOTO, S., MACABALANG, A. D., NAKATANI, K., OBARA, Y., NAKAHATA, N., OHTA, T. Tricholomalides A-C, new neurotrophic diterpenes from the mushroom *Tricholoma sp.* *Journal of Natural Products*, 2003, vol. 66, s. 1578-1581.

VÉLE, J. Nahuby.sk, 2006
(http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=93721), čerpáno dne 27.10.2009

VOLF, F., ŠEBÁNEK, J., PROCHÁZKA, S., SLADKÝ, Z., KUBJATKO, F., KROPÁČ, Z. *Zemědělská botanika*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1988. 384s. s. 180, 192.

VON JAGOW, G., GRIBBLE, G. W., TRUMPOWER, B. L. Mucidin and strobilurin A are identical and inhibit electron transfer in the cytochrome bc₁ complex of the mitochondrial respiratory chain at the same site as myxothiazol. *Biochemistry*, 1986, vol. 25, s. 775-80.

WALTEROVÁ, A. Nahuby.sk, 2006
(http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=44149), čerpáno dne
27.10.2009

WANG, F., LIU, J. K. Two new steryl esters from the basidiomycete *Tricholomopsis rutilans*. *Steroids*, 2005, vol. 70, s. 127-130.

WICHLACZ, M. ,AYER, W. A. , TRIFONOV, L. S. , CHAKRAVARTY, P. ,
KHASA, D. Two 6,7-seco-caryophyllenes and an alloaromadendrane from liquid
cultures of *Hebeloma longicaudum*. *Phytochemistry*. 1999. vol. 52, s. 1421-1425.

WOOS, W. F., BRANDES, M. L., WATSON, R. L., JONES, R. L., LARGENT, D.
L. Fungal metabolites. 41. trans-2-Nonenal, the cucumber odor of mushrooms.
Mycologia, 1994, vol. 86, s. 561-3.

YAN, CH., YERSIN, A., AFRIN, R., SEKUGUCHI, H., IKAI, A. Single molecular
dynamic interactions between glycophorin A and lectin as probed by atomic force
microscopy. *Biophysical Chemistry*, 2009, vol. 144, s. 72-77.

VII. ABSTRAKT

Dočkalová, J. Biologická aktivita makromycet – B. Diplomová práce 2010,
Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 105 s.

Klíčová slova: houby, *Agaricales*, obsahové látky, antioxidační aktivita, DPPH

V rámci této diplomové práce bylo zpracováno 14 taxonů hub z řádu *Agaricales* (čeleď *Agaricaceae*, *Amanitaceae*, *Bolbitiaceae*, *Coprinaceae*, *Cortinariaceae*, *Entolomataceae*, *Hygrophoraceae*, *Lycoperdaceae* a *Tricholomataceae*), z jejichž plodnic bylo připraveno za standardních podmínek 14 lyofilizovaných extraktů. Tyto extrakty byly hodnoceny na obsah různých skupin látek za použití tenkovrstvé chromatografie (TLC), která byla realizována vzestupným způsobem v chromatografických komorách. U všech taxonů byly v souladu s dříve publikovanými výsledky detekovány aminokyseliny, sacharidy, karboxylové kyseliny, fenolické látky, steroly, steroidy a triterpeny. Téměř u všech taxonů (kromě *Cortinarius traganus* a *Oudemansiella mucida*) byla pozitivní detekce na alkaloidy. U detekce na fenoly a aminy byla pozitivní reakce u *Amanita crocea*, *Bolbitius vitellinus*, *Cystoderma terreii*, *Psathyrella multipedata*, *Tricholoma album*, *Tricholomopsis decora* a *Cortinarius traganus*.

U všech připravených lyofilizátů byl proveden screening antioxidační aktivity pomocí DPPH testu s využitím metody SIA, která umožňuje monitorování a vyhodnocování antioxidační aktivity ve velkém počtu vzorků. U žádného z testovaných vzorků nebyla antioxidační aktivita natolik vysoká, aby bylo možné vypočítat hodnotu EC_{50} , což je koncentrace potřebná pro snížení absorbance o 50 %. V porovnání se standardními antioxidanty ($EC_{50kys.asc.} = 0,006$ mg/ml, $EC_{50trolox} = 0,014$ mg/ml) je tedy antioxidační aktivita měřených vzorků velmi nízká. Nejvyšší antioxidační aktivitu z testovaných vzorků vykazoval taxon *Cystoderma terreii* (% $Q_{0,5} = 40,88$).

VIII. ABSTRACT

Dočkalová, J. Biological activity of macromycetes – B. **Diploma thesis 2010,**
Charles University of Prague, Faculty of Pharmacy Hradec Králové, 105 s.

Keywords: fungi, *Agaricales*, content substances, antioxidant activity, DPPH

Fourteen taxons of macromycetes from order *Agaricales* (family *Agaricaceae*, *Amanitaceae*, *Bolbitiaceae*, *Coprinaceae*, *Cortinariaceae*, *Entolomataceae*, *Hygrophoraceae*, *Lycoperdaceae* and *Tricholomataceae*) were studied within this diploma thesis. 14 lyophilized extracts were prepared under the standard conditions from fruiting bodies of the mushrooms. These extracts were evaluated for the content of different groups of substances by the thin-layer chromatography (TLC), which was carried out in the chromatographic chambers by the linear development. Amino-acids, saccharides, carboxylic acids, phenolic substances, sterols, steroids and triterpens were recorded in all taxons. This was in accordance to the previously published outcomes. All taxons except *Cortinarius traganus* and *Oudemansiella mucida* performed positive detection on alkaloids. Species *Amanita crocea*, *Bolbitius vitellinus*, *Cystoderma terrei*, *Psathyrella multipedata*, *Tricholoma album*, *Tricholomopsis decora* and *Cortinarius traganus* had a positive reaction on detection of phenols and amines.

Screening of an antioxidant activity of the samples by the SIA method (DPPH test) was implemented in all lyophilizates. This method enables monitoring and assessment of many samples. No tested macromycete sample provided the antioxidant activity high enough to be able to calculate the EC_{50} value, which is a concentration necessary to decrease the absorbance to 50 %. The antioxidant activity of the measured samples was very low in comparison with standard antioxidants ($EC_{50\text{asc.ac.}} = 0,006\text{ mg/ml}$, $EC_{50\text{trolox}} = 0,014\text{ mg/ml}$). Taxon *Cystoderma terrei* performed the highest antioxidant activity value of all of the analysed samples (% $Q_{0,5} = 40,88$).